



VANESSA FERREIRA DE SANTANA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIBISCO
(*Hibiscus sabdariffa* L.) E DA PITAIA (*Hillocereus costaricensis*)
ATRAVÉS DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E
ESPECTROFOTOMETRIA**

São Luís
2022

VANESSA FERREIRA DE SANTANA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIBISCO
(*Hibiscus sabdariffa* L.) E DA PITAIA (*Hillocereus costaricensis*)
ATRAVÉS DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E
ESPECTROFOTOMETRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado de Curso da Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Graduação em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Isaide de Araujo Rodrigues.

São Luís
2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ferreira de Santana, Vanessa.

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO HIBISCO *Hibiscus sabdariffa* L. E DA PITAIA *Hillocereus costaricensis* ATRAVÉS DE VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL E ESPECTROFOTOMETRIA / Vanessa Ferreira de Santana. - 2022.
58 f.

Orientador(a): Isaide de Araujo Rodrigues.

Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, 2022.

1. Capacidade antioxidante total. 2. DPPH. 3. Hibisco. 4. Pitaia. 5. Voltametria de pulso diferencial. I. de Araujo Rodrigues, Isaide. II. Título.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a ISAIDE DE ARAUJO RODRIGUES
Orientadora – DEQUI/CCET/UFMA

Prof.^a Dr.^a ILANNA CAMPELO LOPES
DETEQI /CCET/UFMA

Prof. Dr. MARCO AURELIO SULLER GARCIA
DEQUI/CCET/UFMA

27 de julho de 2022

Dedico este trabalho aos meus queridos avós Inês e Isaias, sem os quais não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser o arrimo da minha sorte, que nunca mudou e nunca faltou; em quem reside toda sabedoria, conhecimento e entendimento.

À minha mãe Iranilde e pai Claudemir, aos tios Ilvania, Ivanildo, Idelvan e Eduardo pelo apoio, incentivo e referencial; e aos meus primos e irmãos pela torcida.

À professora Dr.^a Isaide por me adotar na pesquisa, e com seu profissionalismo e bom humor ensinar não só os primeiros passos na eletroquímica, mas também sinalizar o caminho.

Aos professores da Coordenação de Engenharia Química (COEQ) pelo ensino: Audirene, Harvey, Diana, Paulo, Lâmia, Valter, Jaiver, João Vitor, Adriana, Romildo, Ana Maria, Tony, Carvajal, Marcelo, Roberto, Elmo e a tantos outros mesmo que não citados.

Aos colegas e professores do laboratório (GELQ) pelo acolhimento e risadas na hora do café; ao mestrando Gustavo pelas discussões e parceria de pesquisa.

Aos queridos colegas de curso por todo o apoio e momentos de companheirismo: Mona, Emanuelle, Carla, Vanessas Sousa e Santana, Mellany, Jéssica, Glauberth, Tayrlan, Felipe, Lailson, Pedro, Gustavo, Ivailson e Vinícius.

À professora Cáritas pela disponibilidade e acolhimento durante o ano em que estive lá; ao laboratório LIM, especialmente à doutoranda Pâmela Luar pela disponibilidade; à FAPEMA, pelo apoio financeiro ao projeto vinculado a este trabalho.

Agradeço a tantas outras pessoas, que mesmo não citadas, certamente marcaram a minha trajetória e contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta importante etapa.

Muito Obrigada!

“Se o experimento estiver dando errado, é porque está certo!”

Professor Iranaldo (Em tom de humor)

“A diferença entre o remédio e o veneno é a dose.”

Paracelso

“O broto pode ter um gosto amargo, mas a flor há de ser doce.”

William Cowper

SANTANA, V. F. **Estudo da atividade antioxidante do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) e da pitaia (*Hillocereus costaricensis*) através de voltametria de pulso diferencial e espectrofotometria.** 2022. 58. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

RESUMO

Os flavonóides são a maior subclasse dentre os 10 mil compostos fenólicos (CFs) já catalogados. Eles são encontrados em plantas na forma de metabólitos secundários, especialmente em flores e frutos vermelhos. Os CFs atuam como antioxidantes, dada à sua capacidade de doar elétrons e prótons e de interromper cadeias oxidativas causadoras de inflamações, envelhecimento precoce e doenças crônicas não transmissíveis. Este aspecto revela a importância do estudo e desperta grande interesse por parte das indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia e por profissionais de ciências dos alimentos. Diante da relevância e do amplo interesse nos benefícios associados aos compostos fenólicos, o presente estudo teve por objetivo investigar a capacidade antioxidante total (CaT) dos frutos hibisco (*Hibiscus Sabdariffa* L.) e pitaia (*Hylocereus costaricensis*), empregando (+) – catequina (10 μ M) como padrão eletroquímico. Para medir a capacidade antioxidante dos frutos, empregou-se a técnica eletroquímica Voltametria de Pulso Diferencial VPD, que fornece o índice eletroquímico *IE*; usou-se também o método do radical livre 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazila (DPPH•), por espectrofotometria UV-vis que fornece o eficiente de concentração EC_{50} . Os valores de *IE* e EC_{50} são inversamente proporcionais e, úteis para análise da capacidade antioxidante total em matrizes complexas. A investigação pelas duas técnicas permitiu concluir que a CaT do hibisco ($IE_{Hib} = 18,35 \pm 0,11 \mu A/V$ e $EC_{50, Hib} = 28,24 \pm 2,07 \text{ mg/mL}$) foi superior em relação à da pitaia ($IE_{Pit} = 1,36 \pm 0,06 \mu A/V$ e $EC_{50, Pit} = 29,69 \pm 0,71 \text{ mg/mL}$), uma vez que o *IE* do hibisco foi maior e seu EC_{50} , menor. A comparação dos dois frutos em relação ao padrão catequina ($IE_{Cat.} = 33,97 \mu A/V$ e $EC_{50, Cat.} = 2,73 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$) destacou o hibisco como detentor de excelente CaT, enquanto indicou um baixo valor de CaT para a pitaia. Apesar do menor valor de CaT da pitaia, o fruto exibiu correlação com a maioria dos flavonóides comparados, indicando grande variedade de CFs. A presença da catequina e de outros flavonóides foi confirmada nos dois frutos, com base na literatura. Portanto, a determinação do *IE* e do EC_{50} através das técnicas VPD e DPPH• foi feita com sucesso, sendo uma alternativa precisa e de baixo custo para avaliar a CaT de frutos em análise de rotina para aplicação industrial e/ou comercial.

Palavras-chave: Hibisco. Pitaia. Capacidade antioxidante total. Voltametria de pulso diferencial. DPPH•.

SANTANA, V. F. **Study of the antioxidant activity of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) and pitaya (*Hillocereus costaricensis*) using differential pulse voltammetry and spectrophotometry.** 2022. 58. Graduate Work (Graduate in Chemical Engineering) – Curso de Engenharia Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

ABSTRACT

Flavonoids are the largest subclass among the 10,000 phenolic compounds (CFs) previously cataloged. They are found in plants in the form of secondary metabolites, especially in flowers and red fruit. CFs act as antioxidants, due to their ability to donate electrons and protons and to interrupt oxidative chains that may cause inflammation, premature aging and non-communicable chronic diseases. This aspect reveals the importance of this study and arouses great attention of the pharmaceutical, cosmetic and food companies as well as food science professionals. Given the relevance and wide interest in the benefits associated with phenolic compounds, the present study aimed at the investigation of the total antioxidant capacity (TaC) of hibiscus (*Hibiscus Sabdariffa* L.) and pitaya (*Hylocereus costaricensis*) fruits, using (+) – catechin (10 μ M) as an electrochemical standard. To measure the antioxidant capacity of the fruits we used Differential Pulse Voltammetry DPV an electrochemical technique which provides the electrochemical index *EI*; the free radical method 2,2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH•) was also used, by UV-vis spectrophotometry, which provides the concentration efficient EC_{50} . The *EI* and EC_{50} values are inversely proportional and useful for analyzing the total antioxidant capacity in complex matrices. The investigation using both techniques led to the conclusion that the TaC of hibiscus ($EI_{Hib} = 18.35 \pm 0.11 \mu A/V$ and $EC_{50, Hib} = 28.24 \pm 2.07 \text{ mg/mL}$) was higher than that of pitaya ($EI_{Pit} = 1.36 \pm 0.06 \mu A/V$ and $EC_{50, Pit} = 29.69 \pm 0.71 \text{ mg/mL}$), since the hibiscus *EI* was higher and its EC_{50} was lower. The comparison of the two fruits in relation to the catechin standard ($EI_{Cat.} = 33.97 \mu A/V$ and $EC_{50, Cat.} = 2.73 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$) highlighted hibiscus as having excellent TaC, while indicating a low TaC value for pitaya. Despite the lower TaC value of pitaya, the fruit exhibited a correlation with most of the flavonoids compared, indicating a wide variety of CFs. The presence of catechin and other flavonoids was confirmed in both fruits, according to the literature. Therefore, the determination of *EI* and EC_{50} using DPV and DPPH• techniques was successful, being an accurate and low-cost alternative to evaluate the TaC of fruits in routine analysis for industrial and/or commercial applications.

Keywords: Hibiscus. Pitaya. Total antioxidant capacity. Differential pulse voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Aumento do número de publicações com os termos “phenolic compounds” nos últimos 20 anos. 8
- Figura 2** – Classificação dos compostos fenólicos em sintéticos e naturais. 10
- Figura 3** – Estrutura básica de um flavonóide (no centro) e nove classes de flavonóides (ao redor) com base no carbono do anel C, em que o anel B ocorre. 12
- Figura 4** – Representação do *Hibiscus sabdariffa L.* 14
- Figura 5** – Espécies de pitaia com valor comercial: A. *Hylocereus undatus* B. *Hylocereus costaricensis* C. *Hylocereus polyrhizus* e D. *Hylocereus megalanthus*. 16
- Figura 6** – A corrente i é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença $i = i_{S_2} - i_{S_1}$ é plotada *versus* o potencial aplicado. 20
- Figura 7** – Estrutura de ressonância e de mobilidade eletrônica na molécula de DPPH•. 22
- Figura 8** – Metodologia de preparo das amostras. 25
- Figura 9** – Representação da célula eletroquímica de três compartimentos, contendo os respectivos eletrodos. 26
- Figura 10** – Esquema de preparo da solução estoque de DPPH• e transferência da alíquota de 2,50 mL da solução para a cubeta de quartzo. 28
- Figura 11** – Estrutura molecular da catequina contendo anéis benzênicos A (resorcinol) e B (catecol) e, um anel pirano C. 30
- Figura 12** – A. Representação da VPD (—) de (+) - catequina $10 \mu\text{M}$ em tampão HCl/KCl pH 2,2. B. Pico 3 visto após ampliação da faixa de potencial de 0,6 a 1,2 V. 31
- Figura 13** – A. Comparação da VPD de catequina (•••) $10 \mu\text{M}$ com a voltametria de hibisco (—) 50 mg/mL em tampão HCL/KCl pH 2,2. B. Destaque dos picos em 0,73 e 0,76 V. 33
- Figura 14** – Estrutura da hesperidina. R = Rutinose (Glicose + Raminose). 35
- Figura 15** – Estrutura dos principais compostos bioativos do *Hibiscus sabdariffa L.* 36
- Figura 16** – Comparação da VPD de catequina (•••) $10 \mu\text{M}$ com a VPD da pitaia (—) 50 mg/mL em tampão HCL/KCl pH 2,2. 37
- Figura 17** – Decaimento de absorvância do radical livre DPPH• ($40 \mu\text{M}$) na ausência (—●—) 0 mg/mL e na presença de extrato a diferentes concentrações: (—●—) 50 mg/mL , (—●—) 30 mg/mL e (—●—) 20 mg/mL no comprimento de onda 516 nm. A. Hibisco e B. Pitaia. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Posicionamento das hidroxilas em 13 flavonóides.....	13
Tabela 2: Reagentes utilizados.	24
Tabela 3: Concentração de extrato na cubeta de 3 mL a cada série do ensaio de DPPH•.....	28
Tabela 4: Potencial de pico de padrões fenólicos.....	32
Tabela 5: Correlação entre os E_{ps} de HS e dos flavonóides da tabela 4, estudados por Rodrigues et al. (2019).	34
Tabela 6: Correlação entre os E_{ps} de pitaia e dos flavonóides da tabela 4.	38
Tabela 7: Dados experimentais de E_p e, I_p para a VPD dos extratos (50 mg/mL) de hibisco e pitaia e do padrão catequina (10 μ M). Índice eletroquímico (IE) apresentado na última coluna.	40
Tabela 8: Dados do ensaio de DPPH• para a (+) – catequina.....	42
Tabela 9: Valores dos EC_{50} obtidos para hibisco e pitaia por ensaio de DPPH•.....	43
Tabela 10: Dados do primeiro ensaio de DPPH• para a pitaia.	57
Tabela 11: Dados do segundo ensaio de DPPH• para a pitaia.....	57
Tabela 12: Dados do terceiro ensaio de DPPH• para a pitaia.....	57
Tabela 13: Dados do primeiro ensaio de DPPH• para o hibisco.	58
Tabela 14 : Dados do segundo ensaio de DPPH• para o hibisco.....	58
Tabela 15: Dados do terceiro ensaio de DPPH• para o hibisco.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaT	Capacidade antioxidante total
CFs	Compostos fenólicos
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EC ₅₀	Eficiente de concentração
EO	Estresse oxidativo
ES	Eletrólito de suporte
E _p	Potencial de pico
I _p	Corrente de pico
IE	Índice eletroquímico
SE	Solução extratora
Espectrofotometria-UV-Vis	Espectrofotometria de ultravioleta e visível
VPD	Voltametria de pulso diferencial
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 JUSTIFICATIVA	2
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO	5
3.2 ANTIOXIDANTES	7
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	8
3.3 FLAVONÓIDES	11
3.4 FRUTOS	14
3.4.1 <i>Hibisco</i>	14
3.4.2 <i>Pitaita</i>	15
3.5 ELETROQUÍMICA.....	17
3.6 ESPECTROFOTOMETRIA.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	24
4.2 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA	24
4.3 AQUISIÇÃO DOS FRUTOS E PREPARO DE AMOSTRA.....	24
4.5 INSTRUMENTAÇÃO	25
4.6 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL	26
4.7 ENSAIO DE DPPH•	27
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 ANÁLISE DOS VOLTAMOGRAMAS E OBTENÇÃO DO <i>IE</i>	30
5.1.3 <i>Obtenção do índice eletroquímico IE</i>	39
5.2 ANÁLISE DA ABSORBÂNCIA E OBTENÇÃO DO EC_{50}	40
5.2.2 <i>Cálculo do eficiente de concentração EC_{50}</i>	42
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE A – CÁLCULOS DE CONCENTRAÇÃO	55
<i>Cálculo da concentração de extrato</i>	55
<i>Diluição do extrato na célula eletroquímica</i>	55
<i>Diluição do extrato na cubeta espectrofotométrica</i>	56
APENDICE B – DADOS DOS ENSAIOS DE DPPH PARA OS FRUTOS	57
<i>Dados da triplicata de Pitaita</i>	57
<i>Dados da triplicata de Hibisco</i>	58

1 INTRODUÇÃO

Uma molécula de antioxidante inibe a oxidação de outras moléculas. Os antioxidantes, mesmo presentes em baixa concentração, retardam significativamente a oxidação de um substrato, de acordo com Sies (1993). A principal classes de antioxidantes naturais é a dos compostos fenólicos (CFs) ou polifenóis, metabólitos secundários onipresentes em frutos e vegetais. A presença dos CFs confere proteção contra patógenos e, características organolépticas às plantas, além de beneficiar a saúde pelo comprovado combate aos efeitos do estresse oxidativo (EO) (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020; GULCIN, 2020; ALARA, ABDURAHMAN e UKAEGBU, 2021).

As muitas aplicações dos polifenóis em alimentos, cosméticos, plásticos, combustível e outras coisas movimentam o mercado mundial, sendo estimada a marca de 1,83 bilhões para o ano de 2023, segundo Chiorcea-Paquim et al., (2020). Nos últimos 20 anos, houve crescimento exponencial no estudo de polifenóis. O principal interesse de cientistas e fabricantes reside na potente ação antioxidante dos CFs e em sua ação bioativa contra problemas degenerativos, cardiovasculares e comprovada ação *in vitro* e *in vivo* contra outras doenças como câncer (TYŚKIEWICZ et al. 2018; ALARA, ABDURAHMAN e UKAEGBU, 2021).

Assim, uma dieta rica em frutos e vegetais ajuda a reduzir o risco das principais doenças humanas devido à presença de CFs. Os flavonóides são a maior subclasse de CFs e, os principais responsáveis pela ação bioativa daqueles alimentos. Os flavonóides por sua vez contêm o grupo das antocianinas, pigmentos responsáveis pela cor vermelha de frutos e flores, embora também confirmam variações do azul ao amarelo. Esses pigmentos são importantes para a relação planta-polinizador e atuam como reguladores de índices glicêmico, lipídico e outros em ratos e humanos (IWASHINA, 2015; GULCIN, 2020; MUTHA, TATIYA e SURANA, 2021).

Avaliar o conteúdo fenólico de frutos e vegetais é útil não somente pelos potenciais efeitos benéficos, mas também, para controlar a qualidade de alimentos *in natura* ou processados; uma vez que o alimento não é imediatamente consumido após a colheita ou produção, mas requer tempo de armazenamento e transporte. Os fornecedores, então, precisam garantir ao consumidor uma entrega segura e com qualidade adequada, por isso há uma constante busca por aumentar a qualidade e o tempo de prateleira dos produtos. O estudo da capacidade antioxidante *in vitro* é uma importante ferramenta para controle de qualidade em análises de rotina (GRANATO et al., 2018; LOURENÇO, MOLDÃO-MARTINS e ALVES, 2019).

Atualmente métodos cromatográficos associados a diferentes sistemas de detecção têm sido usados para monitorar o conteúdo fenólico total em amostras vegetais. Apesar de sua excelência, demandam reagentes caros e potencialmente tóxicos, além de tratamento prévio da amostra. Desta forma, técnicas eletroquímicas voltamétricas são uma alternativa estratégica para estudar o conteúdo fenólico total em análises de rotina, devido à sua rapidez, reprodutibilidade e baixo custo. Além disso, vários estudos utilizam, em conjunto com a eletroquímica, métodos espectrofotométricos como o ensaio de DPPH•, por ser um radical livre de baixo custo e estável (HOYOS-ARBELÁEZ, VÁZQUEZ e CONTRERAS-CALDERÓN, 2017; SULIASIH, TAWWABIN e BUDI, 2021; HACKE et al. 2022).

Diante disso, o presente estudo buscou investigar a capacidade antioxidante total (CaT) de dois frutos vermelhos o hibisco (*Hibiscus Sabdariffa L.*) e a pitiaia (*Hylocereus costaricensis*) pelo índice eletroquímico (*IE*), usando a técnica eletroquímica voltametria de pulso diferencial (VPD) e pelo eficiente de concentração (EC_{50}), usando Espectroscopia UV-Vis pelo método do radical livre DPPH• proposta por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

1.2 JUSTIFICATIVA

Os vegetais e frutos são ricos em antioxidantes naturais. Dentre os quais, os CFs são os mais diversificados e onipresentes no reino vegetal. Os flavonóides são majoritários dentre os CFs e importantes não somente pela ação no metabolismo das plantas, como também pela diversidade em ação bioativa no organismo. Polifenóis presentes em alimentos, quando ingeridos, protegem as células contra o EO e reduzem o risco de danos crônicos do EO, associado a diferentes doenças degenerativas, como: câncer, osteoporose, problemas cardíacos e neurais (IWASHINA, 2015; ROSA et al., 2018; MUTHA, TATIYA e SURANA, 2021).

Diante disso, o estudo dos CFs quadruplicou nos últimos 20 anos, com vistas a identificar novas substâncias e, obter a capacidade antioxidante total em matrizes vegetais. Dentre os frutos com pigmento vermelho, destacam-se a pitiaia e o hibisco, ambos mundialmente comercializados, consumidos e usados com fins medicinais; suas propriedades bioativas estão diretamente ligadas à presença dos antioxidantes naturais (TYŚKIEWICZ et al. 2018; MÁRQUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020; ATTAR et al., 2022).

Apesar da excelência obtida por métodos cromatográficos acoplados a diferentes sistemas de detecção, por exemplo: Cromatografia Gasosa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando coluna de fase reversa, ambos acoplados com espectrofotometria UV-Vis e detecção eletroquímica; eles requerem uso de reagentes poluentes, elevado custo e

levado custo e tempo de análise e/ou pré-tratamento da amostra. Diante disso, a eletroquímica através da voltametria de pulso diferencial representa uma alternativa estratégica na análise de rotina em matrizes vegetais, pois permite performances rápidas, precisas e de baixo custo; além da possibilidade de miniaturização e portabilidade (HOYOS-ARBELÁEZ, VÁZQUEZ e CONTRERAS-CALDERÓN, 2017; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020).

É comum o confronto entre VPD e ensaio de DPPH• porque ambos se baseiam no princípio de transferência de um único elétron, segundo Hoyos-Arbeláez, Vázquez e Contreras-Calderón, (2017). A correlação pode ser feita através *IE* e *EC*₅₀, que são valores inversamente proporcionais. Por fim, investigar a CaT *in vitro* de frutos e vegetais é relevante, não somente do ponto de vista medicinal, mas também, para uso (1) em tecnologia de alimentos, na definição do melhor tipo de corte (com base na área do vegetal exposta ao meio), (2) na análise da influência do processamento sobre a estabilidade dos CFs e (3) para assegurar a qualidade final de produtos alimentícios em análises de rotina (GOMES et al., 2015; GRANATO et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a capacidade antioxidante total (CaT) dos frutos pitaia (*Hylocereus costaricensis*) e hibisco (*Hibiscus sabdariffa L.*) e do padrão analítico (+) – catequina, através da técnica eletroquímica voltametria de pulso diferencial (VPD) e do método espectrofotométrico do radical livre DPPH• baseado no ensaio de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o Índice Eletroquímico IE ($\mu\text{A/V}$) por meio da VPD e o Eficiente de Concentração EC_{50} (mg/mL) pelo ensaio de DPPH•.
- Empregar VPD usando eletrodo de carbono vítreo (ECV) para analisar a CaT das amostras de hibisco, pitaia e catequina pelo cálculo do IE ($\mu\text{A/V}$).
- Empregar o método do DPPH• para analisar a CaT das amostras de hibisco, pitaia e (+) – catequina pelo cálculo do EC_{50} (mg/mL).
- Comparar a CaT dos dois frutos com base nos valores de IE ($\mu\text{A/V}$) e EC_{50} (mg/mL) calculados.
- Analisar o perfil flavonólico dos dois frutos pela comparação entre os voltamogramas de pulso diferencial e o padrão flavonólico da (+) – catequina nas mesmas condições.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

A homeostasia redox ou equilíbrio de oxidação-redução, assim como o controle do pH nos compartimentos celulares, é fundamental para a vida. Os processos redox permeiam desde a regulação bioenergética e metabólica até às funções vitais do organismo. O conceito médico e biológico chamado estresse oxidativo proveniente do desequilíbrio redox, tem sido alvo de ampla investigação nas últimas décadas, como aprofundam Sies, Berndt e Jones (2017).

Todavia, é necessário distinguir o estresse prejudicial do estresse positivo. Enquanto, o estresse oxidativo severo leva ao dano generalizado e à morte celular, o estresse em nível moderado ou positivo é fundamental na manutenção da saúde porque estimula (1) sinalização celular (2) resposta celular a patologias e, (3) tolerância a doenças associadas ao envelhecimento como a isquemia e a doença de Parkinson (YAN, 2014; DUBOIS-DERUY, 2020).

Conforme discutido por Barbosa et al. (2010), a mitocôndria é a principal geradora de radicais livres (RL). Nessa organela, o O_2 sofre redução tetravalente, onde a reação é catalisada pela **enzima citocromo oxidase** que, ao final da cadeia transportadora de elétrons, oxida quatro moléculas de citocromo C, retirando um elétron de cada uma. A enzima controla a geração de radicais livres, de modo que apenas 2 a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados a outra via metabólica, dando origem aos radicais livre superóxido (O_2^*), hidroxila (OH^*) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

O H_2O_2 , porém, não é um radical livre por não possuir elétron desemparelhado na última camada. Apesar disso, participa (via reação de Haber-Weiss) da formação de OH^* – o mais reativo dos radicais livres por modificar qualquer estrutura próxima. Além disso, a lenta reação do H_2O_2 frente a certas biomoléculas (reação de segunda ordem $1 M^{-1}s^{-1}$) lhe permite, diferente do OH^* , atravessar membranas e difundir-se para meios mais reativos. Ademais, sua toxicidade é aumentada em 10 mil vezes na presença de íons ferro (BARBOSA et al., 2010; SIES, BERNDT e JONES, 2017).

3.1.1 Estresse oxidativo e doença

O estresse oxidativo (EO) tem relação dinâmica de causa e efeito com doenças crônicas. Processo em que, as espécies oxidativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de

nitrogênio (ERN) e RL acarretam EO pela proliferação de células de defesa, resposta inflamatória a citocinas, peroxidação lipídica, mutagênese, ligação cruzada de proteínas e alteração epigenética. Esse desequilíbrio redox gera dano celular pela modificação de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e de outras moléculas (NETO e NALESSO, 2021).

Tais efeitos prevalecem, causam danos e contribuem para a evolução de diversas doenças, quando os níveis de antioxidantes não são suficientes para a adequada proteção tecidual. O EO foi observado em doenças metabólicas, neurodegenerativas e também em hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade (considerada uma condição inflamatória crônica), infecção viral por SARS-CoV-2, e muitas doenças auto imunes como doença de Crohn (infecção crônica da membrana intestinal), artrite reumatoide e até aterosclerose que são placas de gorduras depositadas nas coronárias (VELLOSA et al., 2021).

3.1.2 Mecanismos de defesa enzimático e não-enzimático

Sabe-se que o organismo é dotado de um mecanismo de defesa antioxidante que atua reduzindo a ação redox deletéria. Sua ação se dá pela (1) prevenção, impedido a formação, (2) interceptação, inibindo a ação e (3) reparo, restaurando estruturas danificadas pelos radicais livres e espécies reativas não-radicalares. Subdivide-se ainda em **sistema enzimático** que inclui as enzimas Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD) e, em **sistema não enzimático** que inclui antioxidantes exógenos: tocoferóis, carotenóides, ascorbato, minerais e polifenóis (BARBOSA et al., 2010; MOHAMMADI, 2019).

3.1.3 Estresse oxidativo e antioxidantes exógenos

Nesse contexto, antioxidantes exógenos naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio de sintomas por bloquear a evolução de doenças ligadas ao estresse oxidativo. Todavia, autores como Ferreira e Matsubara (1997) e Sies, Berndt e Jones (2017) discutem que no uso de medicamentos que contenham antioxidantes exógenos, a dose, a via de administração e a efetividade do antioxidante para cada doença, devem ser criteriosamente avaliados.

Por outro lado, o consumo de plantas medicinais e de alimentos ricos em compostos fenólicos (CF) representa uma alternativa natural de prevenir diversas doenças crônicas e de melhorar a saúde. Isso porque esses antioxidantes naturais possuem uma variedade de ações bioquímicas como a de inibir a produção de ERO, sequestrar radicais livres, quelatar metais e eliminar danos ao DNA pelo fortalecimento do sistema antioxidante endógeno e de seus

mecanismos de defesa. Há que se enfatizar, porém, que o fato de serem naturais não os torna seguros por padrão (ADWAS et al., 2019; GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2021).

Dentre as diversas atividades biológicas dos CFs, a sua capacidade antioxidante tem sido alvo de maior estudo. Flavonóides, flavanonas, flavonas, flavonóis e isoflavonas são exemplos de CFs encontrados em cereais, bebidas, frutos e vegetais. A literatura aponta que o consumo de alimentos naturais ricos desses antioxidantes proporciona maior proteção contra agentes tóxicos, doenças crônicas e relacionadas (ADWAS et al., 2019).

3.2 ANTIOXIDANTES

O primeiro estudo acerca do retardamento de oxidações data de 1797 com Claude Berthollet, que 20 anos mais tarde teve seus estudos aprimorados por Humphry Davy. Em 1852, Wriigh notou que índios americanos do Vale do Ohio usavam casca de omeiro para conservar gordura de urso, levando 30 anos mais tarde à patente do produto. Por volta da primeira guerra mundial, os pesquisadores Moureu e Dufraise testaram a atividade antioxidante de mais de 500 substâncias, e na década de 30 o cientista húngaro Albert Szent György foi laureado com um Nobel por ter isolado o flavonóide Rutina a partir de laranjas (RAMALHO e JORGE, 2006; OS ANTIOXIDANTES, 2009).

Basicamente, uma molécula de antioxidante inibe a oxidação de outras moléculas em diversos substratos. Por isso, os antioxidantes se tornaram indispensáveis às indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. A capacidade dos antioxidantes de sequestrar radicais livres, aumenta o tempo de prateleira, por exemplo, por retardar a peroxidação lipídica, que é uma das principais causas de deterioração em alimentos e produtos farmacêuticos, durante seu processamento e armazenamento (GULCIN, 2020; ALBUQUERQUE et al., 2021).

Os CFs podem ser antioxidantes sintéticos ou naturais. Os conservantes sintéticos mais popularmente usados são os compostos fenólicos: galato de propila (PG), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), galato de octilo (OG) e hidroxianisol butilado (BHA). Os sintéticos são potencialmente tóxicos e seu uso é limitado e regulamentado por norma, o que leva o consumidor e a indústria a buscarem por opções mais seguras. Os antioxidantes naturais são mais seguros, possuem ação antifúngica, antimicrobiana, proteção UV e ação bioativa, ligada ao retardamento de inflamações e doenças crônicas (GULCIN, 2020; ALBUQUERQUE et al., 2021).

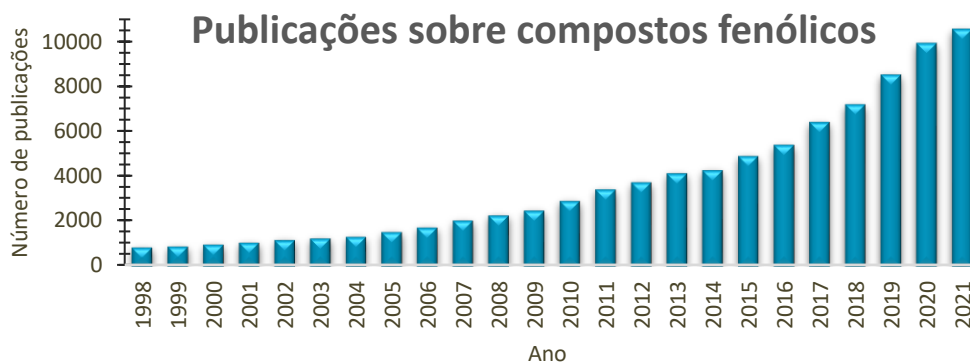
3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os antioxidantes naturais podem ser classificados em três principais classes: vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos. Os CFs são a classe mais diversificada dentre os três e mais estudada atualmente, devido às suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e modulação enzimática em células. Vários estudos epidemiológicos e clínicos sugerem e comprovam a relação inversa entre alto consumo de compostos fenólicos e a incidência de doenças crônicas não transmissíveis (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016; LAURA et al., 2019; LOURENÇO, MOLDÃO-MARTINS e ALVES, 2019; ALBUQUERQUE, 2021).

Os compostos fenólicos são naturalmente encontrados em microrganismos, fungos, bebidas, cereais, frutos e até mesmo em tecido animal. Sua estrutura básica consiste de um anel benzênico ligado a uma ou mais hidroxilas. Podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis de acordo com o número de fenol na molécula. Até 2021, a literatura reportou mais de 10.000 desses compostos e, esse número está em constante expansão, pois é grande a variedade de CFs na natureza, indicando que outros fenólicos ainda aguardam ser identificados (VUOLO, LIMA e JUNIOR, 2019; GULCIN, 2020; BERHANU, TADESSE e JORGE, 2022).

O número de publicações sobre os CFs quadruplicou nas duas últimas décadas, ultrapassando 10.000 publicações em 2021, como mostra a figura 1. Esses resultados foram encontrados pelo portal da CAPES¹, na base Web Science pela pesquisa dos termos “phenolic compounds”. Em outra pesquisa, usando os mesmos termos, porém na base Science Direct, os autores Tyśkiewicz et al. (2018) encontraram um volume ainda maior, chegando a 20.000 publicações durante ano de 2017.

Figura 1 – Aumento do número de publicações com os termos “phenolic compounds” nos últimos 20 anos.



Fonte: Autoria própria. Pesquisa feita na Web Science por meio do portal da CAPES.

¹ CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

3.2.1 Atuação nas plantas

Os CFs são onipresentes no reino vegetal e ocorrem como produtos do metabolismo secundário nas plantas, onde proporcionam (1) pigmentação e adstringência, (2) proteção contra luz UV, parasitas e insetos e (3) funcionam como sinalizadores, atraindo polinizadores ou animais para dispersão de sementes. As práticas anteriores e seguintes à colheita: irrigação, propriedades do solo, temperatura, fertilizantes, estado de maturação, manuseio e exposição à luz são exemplos de fatores que regulam a quantidade final de CFs nos frutos e vegetais (RENE et al., 2010; ROSA et al., 2018; ALBUQUERQUE, 2021).

3.2.2 Benefícios de consumo

Nos organismos aeróbicos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio EROs/ERNs são subprodutos do metabolismo normal, mas podem causar dano oxidativo, mesmo em condições normais. A produção e acúmulo dessas espécies são próprios de doenças e agressões externas e causa também sério dano como disfunção e/ou morte celular. O sistema enzimático do organismo restaura a homeostasia redox, mediante a ação de enzimas como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (SALEHI et al., 2018).

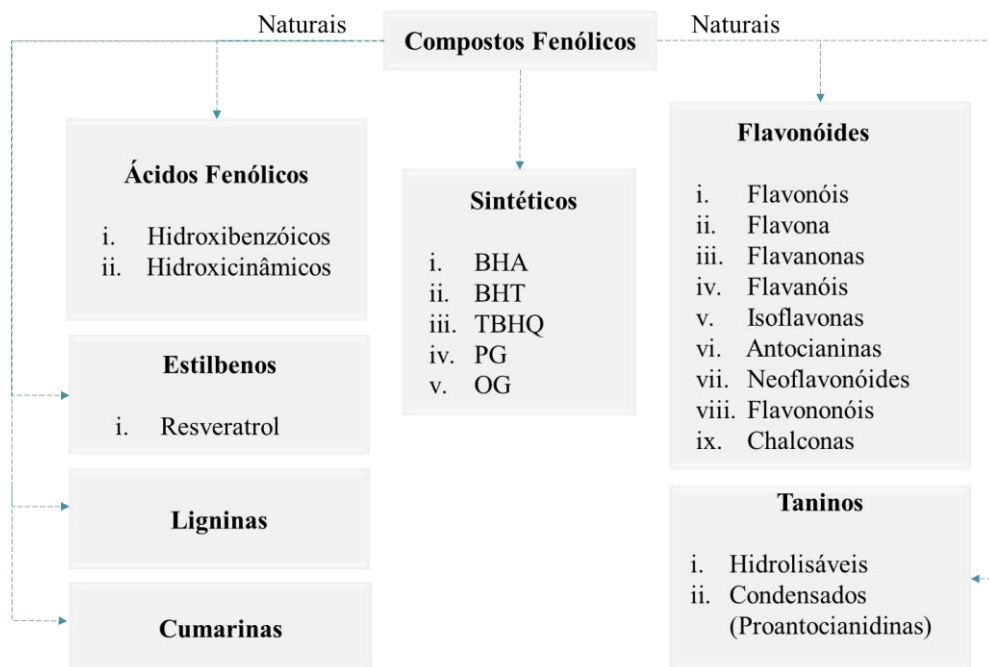
Por outro lado, o alto consumo de antioxidantes oriundos de frutos e vegetais também tem sido fortemente associado à homeostasia redox e à baixa incidência de patologias crônicas. Um estudo de Salehi et al. (2018) analisando os efeitos positivo ou negativo do consumo de antioxidantes concluiu que uma (1) dieta variada com grãos, frutos e legumes de diferentes cores, (2) não fumar, reduzir o consumo alcoólico e (3) exercitar-se regularmente para evitar a obesidade é a melhor forma de minimizar os danos crônicos do desequilíbrio redox (SALEHI et al. 2018).

Em estudos clínicos, Rabbani et al. (2021) verificaram que o consumo de trans resveratrol e hesperetina (90-120 mg) reduziu a disglucemia, a inflamação vascular, a pressão arterial e a dislipidemia em indivíduos saudáveis, com excesso de peso e obesos. Entretanto, segundo Salehi et al., 2018, suplementos de antioxidantes devem ser usados apenas para corrigir déficits, seu consumo não deve ser usual devido ao risco de efeitos adversos, por exemplo, má formação gestacional.

3.2.3 Classificação

Carotenóides, vitaminas e compostos fenólicos são as principais classes de antioxidantes naturais. Dentre as quais, os compostos fenólicos são os mais diversificados e podem ser subdivididos em **naturais**: ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, estilbenos, ligninas; e **sintéticos**, como mostra o esquema da figura 2. Dentre os CFs sintéticos estão os conservantes mais popularmente usados pela indústria alimentícia: BHA, BHT, TBHQ, PG e OG (LOURENÇO, MOLDÃO-MARTINS e ALVES, 2019; GULCIN, 2020).

Figura 2 – Classificação dos compostos fenólicos em sintéticos e naturais.



Fonte: Compilado de Shahidi e Ambigaipalan (2015); Gulcin (2020) e Alara, Abdurahman e Ukaegbu (2021).

Os **ácidos fenólicos** são compostos derivados tais como, os hidroxibenzóicos (i) que derivam do ácido benzóico e representam os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza; e os hidroxicinâmicos (ii) que derivam dos ácidos cinâmicos. As **cumarinas**, por sua vez, são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002; ALARA, ABDURAHMAN e UKAEGBU (2021)).

→As **Ligninas** são polímeros complexos, rígidos e mecanicamente resistentes, a sua hidrólise alcalina libera alta variedade de derivados dos ácidos cinâmico e benzóico (SOARES, 2002). Até o momento, podem ser encontradas em mais de 70 famílias de plantas, sendo que mais de 100 neoligninas e 200 ligninas clássicas já foram caracterizadas (GULCIN, 2020).

Enquanto que, os **Estilbenos** ocorrem em pequena quantidade na dieta humana e principalmente na forma de resveratrol, e tem sido consideravelmente investigado por sua ação anti-inflamatória, anticarcinogênica e cardioprotetora. Os **Taninos** são divididos em: (i) taninos hidrolisáveis, que contêm uma glicose central ligada a uma forma esterificada de ácido gálico e (ii) taninos condensados, chamados de proantocianidinas, pois quando aquecidos em solução alcoólica ácida, degradam-se formando antocianidinas (ALARA, ABDURAHMAN e UKAEGBU, 2021.).

Por fim, os **Flavonóides** que representam o mais vasto grupo de polifenólicos naturais, onipresentes em frutos, vegetais e plantas medicinais. Sua estrutura básica consiste de um núcleo flavan ou flavílium com 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis benzênicos A e B e um anel pirano C. São classificados em: flavonas, flavanonas, flavonóis, flavanóis, antocianinas e isoflavonas também em flavononóis, neoflavonóides e chalconas, dependendo do carbono no anel C, onde o anel B é substituído (KARAK, 2019; ALARA, ABDURAHMAN e UKAEGBU, 2021).

3.3 FLAVONÓIDES

O termo flavonóides (ou bioflavonóides) é a designação de um grande número de metabólitos secundários da classe dos polifenóis. Trata-se da classe mais diversificada dentre os compostos fenólicos, representando pelo menos dois terços dos CFs. As mais de 9 mil formas de flavonóides, catalogadas até o momento, são onipresentes em frutos, flores, vegetais, mel e em alimentos processados como vinho e chá (KARAK, 2019; ABOU BAKER, 2022).

A maioria dos **pigmentos** em plantas superiores são clorofilas, carotenóides e flavonóides. Desses, as duas últimas classes são as principais responsáveis pela pigmentação em flores; além dos pigmentos como antocianinas, chalconas, auronas e flavonóis. A cor representa uma ligação entre a flor e o polinizador, pois este auxilia na perpetuação da espécie vegetal. Os insetos – diferente dos humanos – podem perceber cores próximas do ultravioleta (340 – 380 nm) e até invisível. Laranja, vermelho, violeta ao azul e até preto são as cores principalmente de antocianinas em flores e frutos (IWASHINA, 2015).

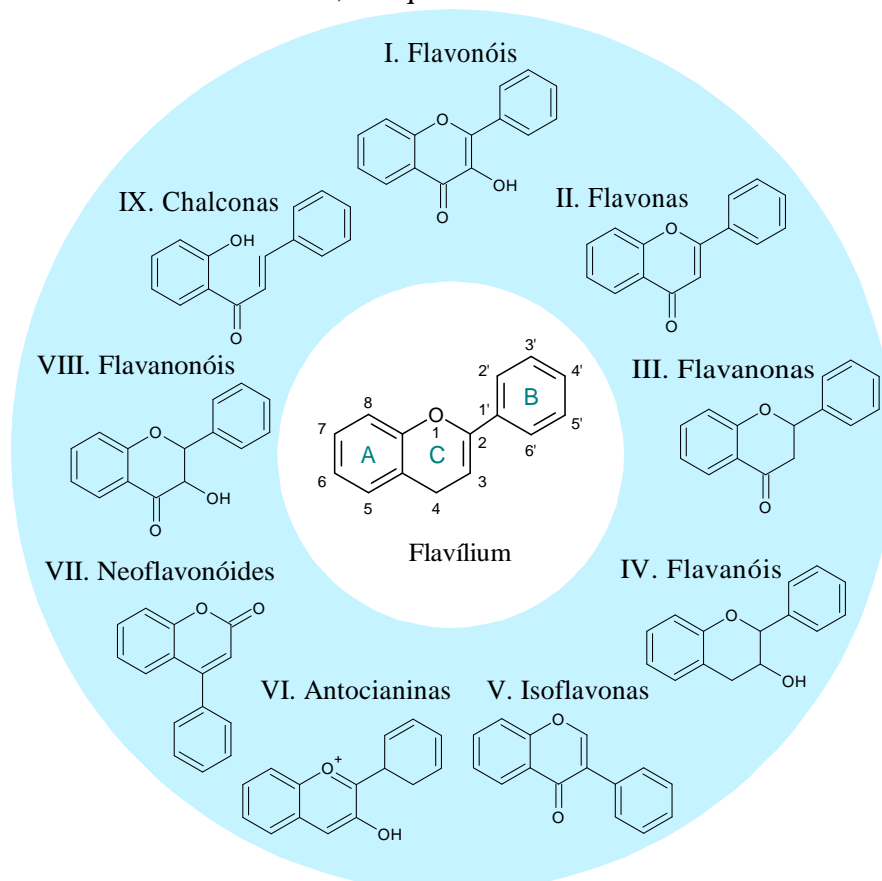
Além da importância dos flavonóides na pigmentação das plantas, destaca-se também sua diversidade em **ação bioativa**. Estudos mostram que polifenóis presentes em alimentos e bebidas induzem (quando consumidos) ao aumento na atividade antioxidante no plasma, pelo acúmulo de agentes redutores. Esses polifenóis, não somente protegem as células e seus componentes do estresse oxidativo, como também, reduzem o risco de danos crônicos do

desequilíbrio redox, associados a diferentes doenças degenerativas, como; câncer, osteoporose, problemas cardíacos e neurais (MUTHA, TATIYA e SURANA, 2021).

YU et al. (2020) verificaram que o extrato aquoso da flor *Inula britannica*, rico em compostos fenólicos, inibiu a adipogênese pela modulação da expansão clonal mitótica e das rotas de quinase 1/2 e Akt nos pré-adipócitos 3T3-L1, mostrando-se efetivo no combate à obesidade. Outro estudo mostrou que o extrato do cálice de *Hibiscus sabdariffa L.* também previne adipogênese nos adipócitos 3T3-L1; bem como, resistência à insulina em ratos induzidos à obesidade por dieta gordurosa (JANSON et al., 2021).

A estrutura de um flavonóide consiste de um núcleo flavílium com 15 átomos de carbono, organizados em 3 anéis (C6–C3–C6): dois aromáticos A e B ligados por uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de anel heterocíclico C (figura 3). Flavonóides podem ser divididos em diferentes subgrupos, dependendo do carbono no anel C em que o anel B está ligado e, do grau de insaturação e oxidação do anel C. Dentro de uma mesma classe, é a posição das hidroxilas nos anéis A e B que diferencia os indivíduos (CONG-CONG, 2017; KARAK, 2019; GULCIN, 2020).

Figura 3 – Estrutura básica de um flavonóide (no centro) e nove classes de flavonóides (ao redor) com base no carbono do anel C, em que o anel B ocorre.



Fonte: Compilado de Panche, Diwan e Chandra, (2016); Karak (2019) e Gulcin (2020).

Ainda sobre a figura 3, flavonóides em que o anel B ocorre na posição 3 do anel C são chamados isoflavonas; aqueles em que o anel B ocorre na posição 4, neoflavonóides. Porém, aqueles em que o anel B ocorre na posição 2 são divididos em outros subgrupos com base nas características do anel C. Esses subgrupos são flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, flavanóis ou catequinas e antocianinas. Por fim, os flavonóides em que o anel C é aberto são chamados de chalconas – ver figura 3 (PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016; KARAK, 2019).

A atividade antioxidante dos flavonóides é afetada pelo total de grupos OH na sua estrutura e tem forte relação com o anel B, especialmente quanto à posição e ao número de hidroxilas desse anel. A tabela 1 exhibe a estrutura de 13 flavonóides. Verificou-se experimentalmente que a presença de hidroxilas nos anéis A (5-OH, 7-OH) e C (3'-OH) contribui para a atividade sequestradora de radicais livres. Entretanto, essa atividade é afetada não somente pela estrutura individual do antioxidante, mas também pelo meio, pelo tipo de radical e pela reação cinética do processo (BIELA et al., 2020).

Tabela 1: Posicionamento das hidroxilas em 13 flavonóides.

FLAVONÓIDE	Substituição em						
	3	5	7	2'	3'	4'	5'
Miricetina	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Quercetina	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Ramnetina	OH	OH	OMe	H	OH	OH	H
Morin	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
Kaempferol	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Narigenina	H	OH	OH	H	H	OH	H
Diosmetina	H	OH	OH	H	OH	OMe	H
Apigenina	H	OH	OH	H	H	OH	H
flavona	H	H	H	H	H	H	H
(+) – Catequina	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Fisetina	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Luteolina	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Isorhamnetina	OH	OH	OH	H	H	OH	H

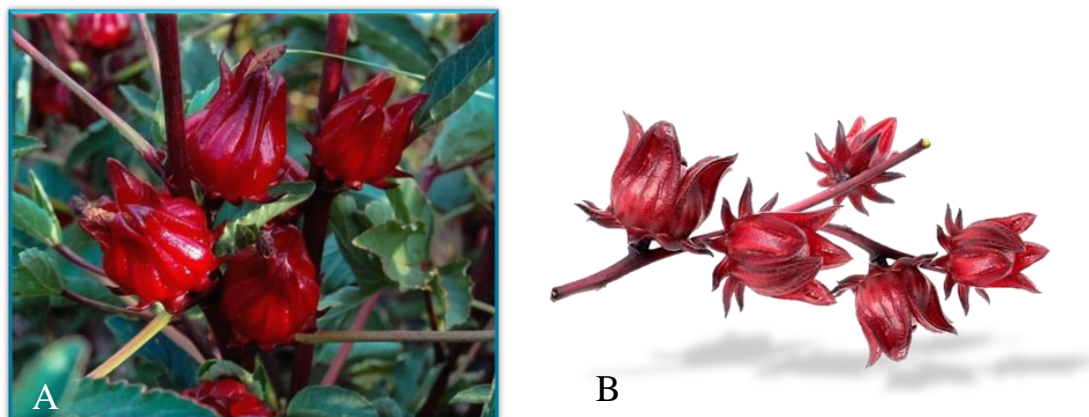
Fonte: Compilado de Husain, Cillard e Cillard (1987); Fang et al. (2019).

Em meio a discussões sobre a habilidade antioxidante de compostos naturais, é comum que os termos **atividade antioxidante** e **capacidade antioxidante** sejam usados sem distinção, apesar de terem sentidos diferentes. “Atividade” refere-se à taxa de reação entre um antioxidante e uma prova oxidável; “capacidade” é a quantidade (em mol) de radical eliminada por mol de antioxidante (GULCIN, 2020; HAQUE et al., 2021).

3.4 FRUTOS

3.4.1 Hibisco

Figura 4 – Representação do *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: A. The plant good seed.² e B. New Directions³

O hibisco (HS), *Hibiscus sabdariffa* L. (figura 4), é nativo da África, mas ocorre em qualquer região de clima tropical e subtropical, segundo Wyk (2014). Essa vasta distribuição faz o fruto ser conhecido por muitos nomes como: vinagreira, caruru-azedo, rosélia, quiabo-roxo, roselle (inglês), l'Oiselle (Francês), Karkade (Árabe), Krachiap daeng (Tailandês) e outros (MAGANHA et al., 2010 e SILVA, 2018).

Possui folhas lóbulos e flores brancas ou amarelas, enquanto as sépalas vermelhas e chamativas (cálice) são cercadas por uma fileira externa de colchetes (epicalyx). Sua sépala ou cálice tem cor vermelho intenso, quando fresca, e escurece à medida que desidrata. O cálice é mundialmente utilizado como: chá, bebidas, geleias, corantes, em cosméticos, sorvetes e, de diversas outras formas. O consumo médio do cálice em bebidas geladas e quentes é de 150–180 mg/kg, na Nigéria (MAGANHA et al., 2010; WYK, 2014; ALARA et al., 2020).

Alara et al., (2020) identificaram 95 flavonóides no cálice do HS; essa quantidade tão expressiva de compostos bioativos explica os efeitos antiparasítico, antifúngico, antibacteriano, antiespasmódico, anti-inflamatório, antinociceptivo, antipirético e antioxidante atribuídos ao extrato do fruto. A aplicação do extrato exibiu aumento no tempo da vida útil de carnes. Outro estudo provou que os polifenóis do extrato diminuem marcadores oxidativos no rim, o perfil lipídico sérico e a neuropatia diabética (MÁRQUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020; MUTHA, TATIYA e SURANA, 2021).

² Disponível em: <<https://www.plantgoodseed.com/products/hibiscus-sabdariffa-seeds>>.

³ Disponível em: <<https://www.newdirections.com.au/100-g-Hibiscus-Sabdariffa-Flower-121-Extract>>. Acessos em abril de 2022.

Sua bioatividade é atribuída à potente ação antioxidante das antocianinas. Ali et al. (2003) verificaram que consumo de antocianinas do fruto em 100 ou 200 mg/kg/dia, durante 5 dias consecutivos, pode reduzir consideravelmente lesões histológicas e danos oxidativos ao fígado; bem como enzimas, no soro, indicativas de danos hepáticos. Entretanto, a dose não deve ultrapassar 4 semanas, devido ao risco de efeitos adversos (ALI et al., 2003; MAJDOUB et al., 2019; OJULARI, LEE e NAM, 2019).

As quatro principais antocianinas conhecidas no cálice do hibisco são em maior proporção delphinidina-3-sambubiósido (D3S) e cianidina-3-sambubiósido (3S), e em menor proporção delphinidina-3-glucósido e cianidina-3-glucósido. Das quais, 85% do total de antocianidinas é a D3S, considerada a principal fonte de capacidade antioxidante do extrato. Os teores de ácido ascórbico são mais elevados no cálice do hibisco do que na laranja e na manga (FREITAS et al., 2013; IZQUIERDO-VEGA et al., 2020).

De acordo com Aina et al. (2021) os constituintes bioativos do fruto têm sido usados para o tratamento de alguns cânceres e de outras doenças, particularmente, doenças associadas ao estresse oxidativo. O *Hibiscus Sabdariffa L.*, portanto, destaca-se por oferecer muitíssimos benefícios ao organismo e comprovada ação *in vitro*, *in vivo* e *in situ* (MÁRQUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020).

3.4.2 Pitaia

O termo “Pitaia” nomeia diversas plantas cactáceas de hábito trepador, de acordo com Lone e Takahashi, et al. (2017). A frutífera é tradicional da América do Sul e Central, mas tem sido cultivada na América do Norte, países do mediterrâneo e subtropicais. O fruto do dragão, fruto pérola, pitahaya ou pitaia já é destaque no mercado europeu e mundial e tem sido procurado pela exuberância, polpa doce repleta de sementes nutritivas e por ser rico em compostos bioativos (PRISA, 2021; ATTAR et al., 2022).

A grande diversidade genética da frutífera, explica a variabilidade dos frutos quanto ao tamanho, cores da casca e polpa e presença ou não de espinhos. O fruto é integralmente aproveitado: a **casca** da pitaia vermelha é ótima substituta de gordura em sorvete e sua farinha enriquece alimentos processados; a **semente** que é rica em ácidos graxos tem efeito laxativo e cosmético (hidrata a pele ressecada e fortalece unhas e cabelos); a **polpa** é consumida *in natura* ou na forma de geleia, mousse, sucos, sorvetes e também usada em cosméticos (ABD GANI, VIJAYAKUMAR e MOKHTAR, 2020; UTPOTT et al., 2020; ATTAR et al., 2022; RORIZ et al., 2022).

O valor comercial está associado pelo menos a quatro grupos de pitáia: (A) *Hylocereus undatus*, fruto oblongo de casca vermelha e polpa branca, (B) *Hylocereus costaricensis*, fruto **globoso** com casca vermelha e polpa vermelha, (C) *Hylocereus polyrhizus*, fruto **oblongo** de casca vermelha e polpa vermelha) e (D) *Selenicereus megalanthus*, a pitáia de casca amarela e polpa branca, como mostrado na figura 5 (GUSMAN, 2001; LONE et al., 2014).

Figura 5 – Espécies de pitáia com valor comercial: A. *Hylocereus undatus* B. *Hylocereus costaricensis* C. *Hylocereus polyrhizus* e D. *Hylocereus megalanthus*.



Fonte: A. Sementerara⁴. B. nswong⁵. C. Jessica Gavin.⁶ D. Gekolife⁷.

Sendo que, as espécies *H. costaricensis/polyrhizus*, detentoras de polpa vermelha, são classificadas no mesmo grupo, de acordo com Morillo – Coronado (2021). Um estudo comparativo mostrou que os fenólicos totais e a capacidade antioxidante total das pitaias de polpa vermelha foram consideravelmente maiores em relação às de polpa branca; o teor de açúcar foi similar e o composto fenólico predominante em ambos os frutos foi a quercetina. A pitáia vermelha (PV) também é rica em ferro (ATTAR et al., 2022).

Attar et al. (2022) verificaram que o suco de PV aumenta os índices de hemoglobina e eritrócitos em mulheres grávidas, sendo uma alternativa para tratar anemia. Em um estudo, o extrato de PV foi efetivo em conservar carne de porco (18 dias a 2°C), pois retardou a perda de cor e degradação oxidativa. Em outro estudo, o efeito citotóxico de *H. costaricensis* em células de câncer foi maior que aquele da *H. megalanthus* e *H. Undatus* e o fruto não mostrou toxicidade em células normais (BELLUCCI et al., 2021; PAŠKO et al., 2021).

As pitaias são fonte de vitaminas B1, B2, B3 e E, betacaroteno, licopeno, potássio e magnésio; suas sementes são laxativas e ricas em ácidos graxos essenciais como, ácido linoleico e linolênico. A atividade antioxidante da pitáia pode ser associada com a presença de ácido ascórbico, carotenóides, polifenóis e especialmente às betalaínas, que também conferem cor às

⁴ Disponível em: <<https://www.sementerara.com.br/pitaya-amarela-dragon-fruit-sementes>>.

⁵ Disponível em: <http://nswong.50webs.com/hylocereus_undatus.htm>.

⁶ Disponível em: <<https://www.jessicagavin.com/what-is-dragon-fruit/>>.

⁷ Disponível em: <<https://gekolife.blogspot.com/2020/09/pitahaya-amarilla-png-pitahaya-en.html>>.

Acessos em abril de 2022.

pitaias e não ocorrem mutuamente com antocianinas (SAFIRA et al., 2021; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2022; et al., 2022).

As betalaínas são pigmentos nitrogenados e aquo-solúveis, presentes apenas em plantas da ordem Caryophyllales. Elas dividem-se em betacianinas (vermelho-violeta) e betaxantinas (amarelo-laranja); e possuem comprovada atividade biológica. Song et al. (2016) demonstraram que betalaínas da pitaiá vermelha reduziram significativamente acúmulo lipídico e aumentaram o HDL⁸ frente a dieta hipercalórica induzida em ratos (CABRITA, SILVA e LAUREANO, 2003; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ et al., 2022).

A pitaiá, portanto, fornece nutrição completa, ausência de toxicidade a células normais e importante atividade antioxidante, úteis no combate ao estresse oxidativo e doenças associadas. Além de ter relevância econômica e potencial aplicação nas indústrias alimentícias e cosméticas. O fruto pode ser processado e armazenado por congelamento, desidratação, fermentação, processamento térmico e conservação química (CROFT, 1998; ABD GANI, VIJAYAKUMAR e MOKHTAR, 2020; PAŠKO et al., 2021; SAFIRA et al., 2021).

3.5 ELETROQUÍMICA

Os métodos eletroanalíticos são frutos do desenvolvimento da eletroquímica. Nesses métodos, os chamados sinais eletroanalíticos são obtidos em resposta à aplicação de perturbações controladas no sistema, como uma diferença de potencial (DDP) entre eletrodos de uma célula eletroquímica, por exemplo. Tais métodos são seletivos – para a espécie avaliada; permitem especificar o potencial e material dos eletrodos; oferecem grande sensibilidade, baixa detecção da corrente de fundo e outras possibilidades (PACHECO, 2013).

3.5.1 Condições experimentais

As condições experimentais têm grande influência sobre as técnicas eletroquímicas. Método eletroquímico, material de eletrodo, meio eletrolítico, concentração das espécies eletroativas e pH influenciam diretamente nos picos de oxidação. A análise de fenólicos naturais é feita em células de três eletrodos, geralmente tendo o eletrodo de trabalho em alguma base de carbono: eletrodo de carbono vítreo (ECV), eletrodo de carbono impresso (SPE⁹ *em inglês*) ou

⁸ High – density lipoprotein (colesterol saudável).

⁹ Screen printed electrode.

eletrodo de diamante dopado com boro (BDD¹⁰ *em inglês*) (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020).

Os eletrodos de carbono são usados porque abrangem ampla faixa de potencial -1.0 V a $+1.4$ V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), são inertes, impermeáveis a gases e fornecem resultados reprodutíveis. Porém, os BDDs são inadequados em potenciais superiores a $+1.4$ V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) devido à formação de hidroxilas, que reagem com os CFs. Eletrodos de metais inertes (ouro e platina) são menos usados porque têm faixa de potencial curta: em potencial superior a $\approx +0.8$ V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) formam óxidos e em potencial negativo sofrem interferência da redução de oxigênio (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020).

Ainda de acordo com a revisão de Chiorcea-Paquim et al., (2020), a eletroquímica comumente emprega contra - eletrodos de platina ou carbono e, Ag/AgCl (3 M KCl) como eletrodo de referência. Por último, também são usadas soluções tampão a base de HCl/KCl e mistura de água e solventes orgânicos como metanol ou etanol, devido à baixa solubilidade dos compostos fenólicos em água.

3.5.2 Voltametria

A técnica eletroquímica mais usada para analisar o comportamento redox de compostos antioxidantes é a voltametria. A qual consiste em medir a corrente que surge entre o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho depois de aplicar-se uma DDP entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Na técnica, o parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente (i), isto é, $i = f(E)$. O registro da corrente em função do potencial recebe o nome de voltamograma e a magnitude da corrente obtida pode ser relacionada à quantidade de analito presente na célula (PACHECO, 2013).

Ela compreende a **voltametria cíclica** (VC), **voltametria de pulso diferencial** (VPD) e **voltametria de onda quadrada** (VOQ). Essas técnicas têm sido proeminentes na análise de antioxidantes. Giovagnoli-Vicuña et al., (2019) usaram VOQ para estudar antioxidantes em mistura de frutos; Schilder et al., (2020) usou VOQ para análise de chás preto e verde, vinhos branco e vermelho e sucos de maçã, oxicoco, mirtilo e framboesa; e Budi, Suliasih e Tawwabin, (2021) empregaram VC e VPD para análise de antioxidantes em mel (HAQUE et al., 2021).

A VC consiste em aplicar um potencial linear com variações crescente e decrescente ao eletrodo de trabalho (em uma solução não agitada). Durante a varredura, o potenciostato

¹⁰ Boron doped diamond electrode.

registra a corrente gerada, em função do potencial aplicado. A técnica é comumente usada por fornecer informações qualitativas, tais como: reversibilidade de reações, termodinâmica de processos redox, cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons ou processos de adsorção. (PACHECO, 2013; HOYOS-ARBELÁEZ, VÁZQUEZ e CONTRERAS-CALDERÓN, 2017).

Na VOQ, uma onda quadrada simétrica, sobreposta sobre uma rampa em formato de degrau, é aplicada ao eletrodo de trabalho. A corrente é amostrada ao final dos pulsos direto e reverso gerados; e a diferença de corrente entre as duas amostragens é registrada em função do potencial. Como resultado, obtém-se discriminação de corrente capacitiva (cuja diminuição é mais rápida do que a corrente faradáica), aumento da velocidade (100 a 1000 mV s^{-1}) e sensibilidade de até 10^{-8} M (ALEIXO, 2003; PACHECO, 2013; HAQUE et al., 2021).

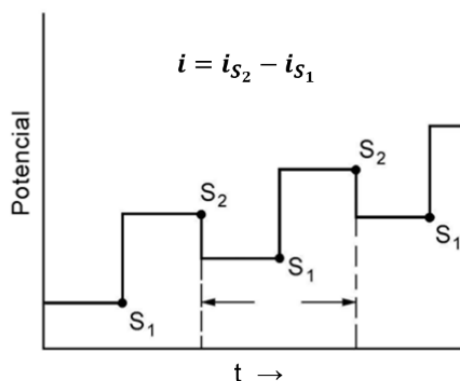
Assim como a VC, usa-se VOQ para verificar a reversibilidade de reações. Apesar de a VOQ ser uma técnica atrativa, a VPD ainda é a mais usada para fins quantitativos. Enquanto a VPD tem velocidade de 1 a 10 mV s^{-1} , a VOQ atinge de 100 a 1000 mV s^{-1} . Assim, a segunda permite realizar experimentos com mais rapidez, mas o limite de detecção para ambas permanece similar (10^{-8} M), pois as duas fazem compensação da corrente capacitiva. Sendo assim, a escolha da técnica mais adequada deve considerar um ajuste de parâmetros, analito e o tipo de resultado requerido (ALEIXO, 2003; PACHECO, 2013; HAQUE et al., 2021).

3.5.3 Voltametria de pulso diferencial

A técnica de pulsos é mais usada para fins quantitativos, devido às vantagens de detecção e de resolução frente às técnicas de corrente contínua. Na VPD, pulsos de amplitude fixos, sobrepostos em uma rampa de potencial crescente, são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida duas vezes, uma antes (S_1) e outra após (S_2) a aplicação do pulso. A diferença entre as duas permite reduzir a corrente capacitiva e é plotada *versus* o potencial aplicado, gerando assim um voltamograma (ALEIXO, 2003; HAQUE et al., 2021).

A figura 6 mostra a dinâmica de potencial para a VPD. Todavia, para usar a técnica é preciso que se ajustem os parâmetros de trabalho como: amplitude de pulso, velocidade de varredura e faixa de potencial. A (1) **amplitude de pulso** geralmente é escolhida entre 10 e 100 mV. Um aumento de amplitude melhora a sensibilidade, mas também reduz a resolução, sendo necessário definir uma amplitude ótima. Tipicamente são usados 25 mV para sistemas com um elétron e 50 mV para sistemas com dois elétrons (ALEIXO, 2003).

Figura 6 – A corrente i é amostrada em S_1 e S_2 e a diferença $i = i_{S_2} - i_{S_1}$ é plotada *versus* o potencial aplicado.



Fonte: Adaptado de Aleixo (2003).

Outro parâmetro ajustável é a (2) **velocidade de varredura**, cujo valor típico é de 5 mV s^{-1} . Velocidades superiores a 10 mV s^{-1} reduzem a resolução. Em todo caso, verifica-se o valor que melhor se ajusta ao analito. A (3) **faixa de potencial** é o intervalo de varredura definido entre os potenciais, inicial e final, e deve abranger todos os picos anódicos do analito, referentes a oxidação. Para compostos fenólicos, vários autores empregam a faixa de 0,0 V a + 1,2 V ou até + 1,4 V (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl) em VPD (ALEIXO, 2003; RODRIGUES et al., 2019; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020).

3.5.4 Índice eletroquímico

A VPD tem sido largamente aplicada ao estudo de antioxidantes naturais, em que a corrente de pico I_p é usada para estimar a capacidade ou a concentração de antioxidante, enquanto o potencial de pico E_p pode ser usado para identificação do(s) antioxidante(s), de acordo com Haque et al., (2021).

$$IE = \left(\frac{I_{p1}}{E_{p1}} \right) + \left(\frac{I_{p2}}{E_{p2}} \right) + \dots + \left(\frac{I_{pn}}{E_{pn}} \right) \quad (1)$$

A equação 1 é aplicada para o cálculo do índice eletroquímico (IE), que considera o E_p e a I_p dos principais picos anódicos em VPD. Esse índice foi introduzido por Blasco et al. (2005) e representa a oxidação não seletiva de todos os polifenóis em uma matriz vegetal. O resultado é interpretado tal que quanto maior o IE, melhor a capacidade antioxidante da amostra e *vice versa*.

3.6 ESPECTROFOTOMETRIA

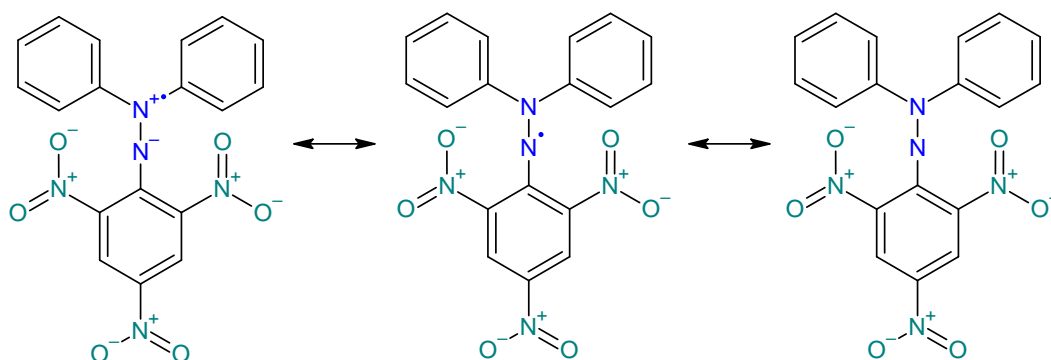
De acordo com Rocha (2004), a espectrofotometria fundamenta-se na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação em amostras. Considerando determinado comprimento de onda tem-se a expressão $A = \log(I_0 / I) = \epsilon bc$, que relaciona a absorvância (A) com o log da razão entre a intensidade de radiação monocromática incidente sobre a amostra (I_0) e a intensidade da radiação emergente da amostra (I). Os termos “ ϵ ” e “ c ” são a absorvância molar e concentração, nessa ordem, ambas da espécie absorvente e b é a distância percorrida pelo feixe através da amostra.

Na espectrofotometria, diferentes métodos como: ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-Sulfônico), ORAC (*Oxygen radical Absorbance Capacity*), FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*) e DPPH• (2,2 - Difênil - 1 - picrilhidrazila) são usados para análise de antioxidantes. Em alguns ensaios, é necessário que os radicais livres sejam gerados, mas o método do radical livre DPPH• dispensa esse procedimento e se destaca por ser simples, rápido, econômico e adequado para mensurar a capacidade antioxidante em alimentos (KEDARE e SINGH, 2011; LINO et al., 2014; OLIVEIRA, 2015).

3.6.1 Método DPPH•

O método de DPPH• é o mais reportado em triagens da capacidade antioxidante de plantas e frutos. Os radicais livres possuem um elétron desemparelhado que os tornam reativos, todavia o DPPH• possui uma estrutura que o torna relativamente estável. Sua molécula é dotada de três anéis aromáticos que lhe conferem estabilidade por ressonância, três grupos NO₂ e dois nitrogênios que permitem deslocamento eletrônico, contribuindo também para a estabilidade de toda a molécula. A figura 7 exibe a estrutura molecular do DPPH• (KAWSAR et al., 2014; OLIVEIRA, 2015; VUOLO, LIMA e JUNIOR, 2019).

Figura 7 – Estrutura de ressonância e de mobilidade eletrônica na molécula de DPPH•.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

O radical possui cor púrpura ou violeta e quando recebe um elétron ou um próton de um antioxidante, a molécula de DPPH• é reduzida para a forma DPPH-H. A redução, que é proporcional à concentração do antioxidante, gera mudança de cor do violeta para o amarelo ou violeta claro e permite monitorar um decréscimo de absorvância no comprimento de onda 516 nm em solução metanólica. Porém, a literatura também reporta variações no comprimento de onda de máxima absorção na faixa de 515-520 nm na presença dos solventes etanol e metanol (KAWSAR et al., 2014; OLIVEIRA, 2015).

O método foi inicialmente proposto por Blois (1958) para avaliar a atividade antioxidante de diferentes amostras, usando um radical livre similar α -difeníl- β -picrilhidrazila. Posteriormente, Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) modificaram o método para estudo do potencial antioxidante de amostras biológicas e compostos fenólicos, propondo também o termo eficiente de concentração EC_{50} para mensurar os resultados. Contudo, o método original ainda sofre muitas modificações, sendo reportados diferentes solventes, concentrações iniciais de DPPH• e tempos de reação (OLIVEIRA, 2015).

Vários autores fazem estudo combinando técnicas voltamétricas, principalmente VC e VPD, com ensaio de DPPH• para analisar diferentes amostras. De Abreu Pinheiro et al. (2021) usaram extrato de pequi, Lino et al. (2014) e Rodrigues (2019) fizeram essa comparação em estudos de vinhos e Suliasih, Tawwabin e Budi (2021) fizeram a comparação em estudo de mel. De acordo com Hoyos-Arbeláez, Vázquez e Contreras-Calderón (2017), a principal razão da correlação entre os métodos espectrofotométricos e eletroquímicos é que ambos são baseados no mecanismo transferência de um único elétron (*SET** do inglês *single electron transfer*).

O ensaio com o radical DPPH•, portanto, representa um dos mais comuns experimentos para a análise de antioxidantes. Em resposta à reação de oxirredução o radical produz um decréscimo de absorvância em torno de 516 nm, tratando-se de uma medição

seletiva para a detecção de compostos antioxidantes, conforme Pires et al. (2017). Esse comportamento foi avaliado em termos do eficiente de concentração (EC_{50}), que representa a quantidade de antioxidante capaz de causar 50% de descoloração, ou perda de atividade, para o DPPH•.

3.6.2 Eficiente de concentração EC_{50}

O EC_{50} foi proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) para interpretar os resultados do DPPH•. O termo é definido como sendo a concentração de substrato capaz de reduzir em 50% a coloração do DPPH• (KEDARE e SINGH, 2011).

O EC_{50} deve ser interpretado de forma inversamente proporcional ao seu valor. Isto é, quanto menor é o valor do EC_{50} , melhor é a capacidade antioxidante da amostra. Esse aspecto representa uma desvantagem em representações gráficas ou numéricas. Por isso alguns autores, como Gomes et al. (2016), preferem representar o resultado na forma de poder antirradical, $ARP^{11} = 1/EC_{50}$, o que não interfere no resultado em si, mas pode tornar a interpretação mais intuitiva. (MOLYNEUX, 2014).

$$\text{Efeito sequestrante do DPPH} \bullet (\%) = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

A eficiência de sequestro do radical livre DPPH• é calculada por meio da equação 2, em que A_0 e A_1 representam a absorbância a $\lambda=516$ nm na ausência e na presença do antioxidante, respectivamente; e a capacidade antioxidante total é expressa na forma de EC_{50} , segundo Gomes et al., 2016 (MARCUCCI et al., 2020).

¹¹ (ARP - Antirradical power.)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho foram solução extratora de metanol/ácido clorídrico (MeOH/HCl 99:1 v/v), solução estoque metanólica de DPPH• (40 µM) e eletrólito de suporte HCl/KCl pH 2,2. Os reagentes estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Reagentes utilizados.

REAGENTE	FÓRMULA	PROCEDÊNCIA
Metanol 99,8%	CH ₃ OH	Merck
Cloreto de potássio	KCl	Merck
2,2 - Difetil - 1 - picrilhidrazila	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sigma - Aldrich
(+) – Catequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Sigma - Aldrich Chemical, St Luis, USA
Ácido clorídrico	HCl	Quimex
Permanganato de Potássio	KMnO ₄	Isofar
Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂	Isofar

Fonte: Autoria própria.

4.2 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA

Para limpeza as vidrarias e utensílios foram imersos em solução de permanganato de potássio baseificada com hidróxido de potássio, por 24h, seguido de imersão em solução de peróxido de hidrogênio 5% acidificada com ácido sulfúrico, por 20 min, e mais 10 minutos em banho de ultrassom na mesma solução. Por último, os materiais e vidrarias foram lavados e enxaguados com água purificada em sistema Milli-Q Academic da Millipore.

4.3 AQUISIÇÃO DOS FRUTOS E PREPARO DE AMOSTRA

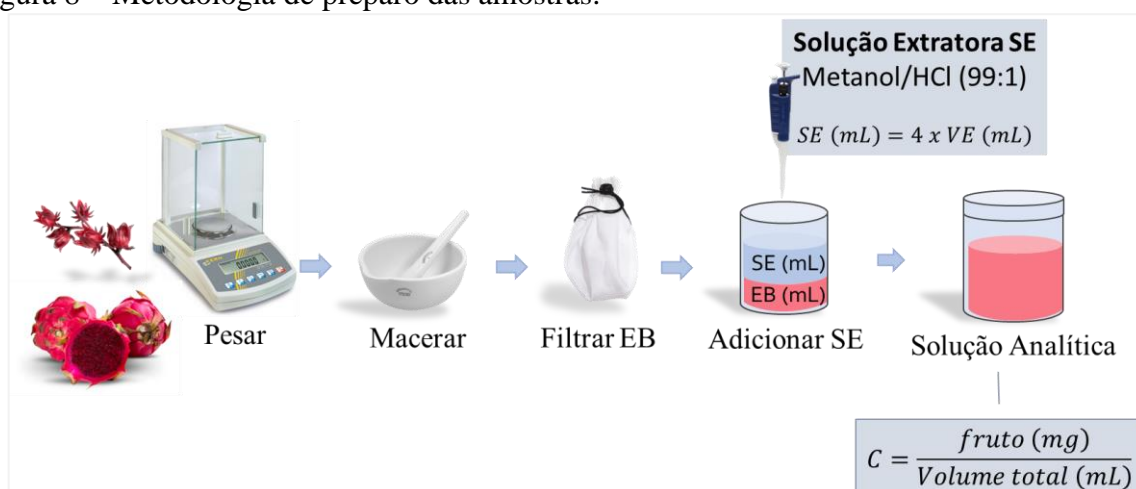
As pitaias, no ponto de amadurecimento, foram obtidas no mercado local da cidade de São Luís – MA, e, após a compra, congeladas (-5 a -1 °C) no Laboratório de Eletroquímica - GELQ da Universidade Federal do Maranhão, para posterior análise. O congelamento objetivou conservar o fruto para uso nas análises, evitando também problemas decorrentes de falta ou escassez de oferta.

Os hibiscos, também foram obtidos em São Luís – MA, e então transportados para o GELQ onde os frutos foram congelados. As sépalas foram manualmente separadas do fruto e lavadas com água purificada, no momento das análises.

O preparo das amostras foi adaptado de Issaad et al. (2017). Durante as análises, usou-se papel alumínio para envolver as vidrarias e inibir a fotodegradação das amostras. A porção de 10 gramas de fruto foi pesada, macerada com almofariz e pistilo e filtrada para um béquer de 200 mL usando-se tecido de *voil* (MESH 200) para obtenção do extrato bruto EB. Este foi diluído em solução extratora SE metanol/ácido clorídrico (99:1 v/v), na proporção EB/SE (1:4 v/v), ou seja, uma parte de EB para quatro partes da SE. Dessa forma, obteve-se o extrato para análise.

A figura 8 mostra as etapas da metodologia de preparo das amostras, bem como, o cálculo de concentração da solução analítica. O cálculo da concentração de extrato, indicado no Apêndice A, foi feito a cada preparo. A concentração foi mensurada em miligrama de fruto por mililitro de solução (mg/mL). Usou-se metanol, conforme necessário, para diluição.

Figura 8 – Metodologia de preparo das amostras.



Fonte: Autoria própria. Coletânea de nswong¹², New Directions¹³, ITISE¹⁴, Loja Synth¹⁵, Elo7¹⁶.

4.5 INSTRUMENTAÇÃO

Para a análise eletroquímica usou-se um Autolab PGSTAT302N e uma célula (10 mL) de três compartimentos, contendo eletrodo carbono vítreo (ECV) como eletrodo de trabalho, platina como contra eletrodo, e prata - cloreto de prata Ag/AgCl (3 M KCl) como eletrodo de referência. Os dados foram coletados pelo software NOVA 2.1.4 da Metrohm AutoLab B. V.

¹² Disponível em: <http://nswong.50webs.com/hylocereus_undatus.htm>

¹³ Disponível em: <<https://www.newdirections.com.au/100-g-Hibiscus-Sabdariffa-Flower-121-Extract>>

¹⁴ Disponível em: <<http://www.itise.pt/produto/balanca-analitica-modelo-als-160-4a/>>

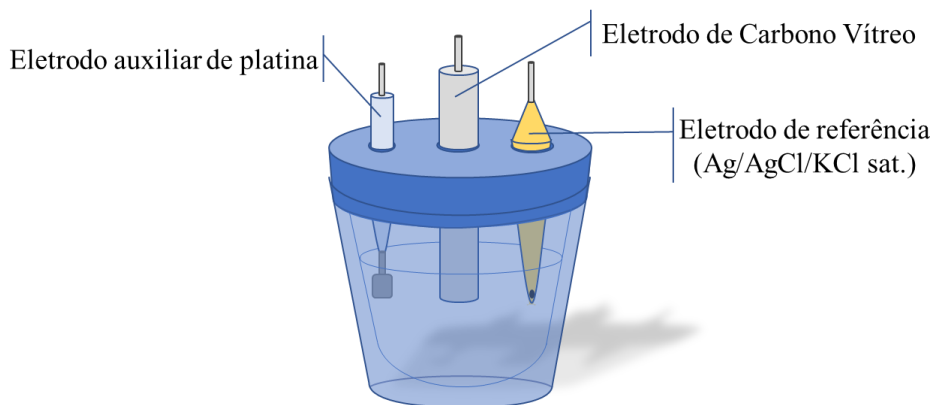
¹⁵ Disponível em: <<https://www.lojasynth.com/porcelanas/grals/gral-almofariz-em-porcelana-com-pistilo>>

¹⁶ Disponível em: <<https://www.elo7.com.br/coador-de-voal-para-leites-vegetais-e-suco-panela-furada/dp/A81A6B>>

Acessos em março de 2022.

A aferição de pH foi feita com um pHmetro K39 – 2014 da KASVI. A figura 9 representa a célula eletroquímica, contendo os três eletrodos.

Figura 9 – Representação da célula eletroquímica de três compartimentos, contendo os respectivos eletrodos.



Fonte: Autoria própria.

Para a investigação espectrofotométrica usou-se um espectrofotômetro UV-Vis IL - 592 da KASUAKI, uma cubeta de quartzo K22-135-Q (3,5 mL) da KASVI com caminho óptico de 10 mm e software MetaSpec Pro versão 2.2.13.0720 para coleta de dados no UV-Vis.

O tratamento de dados para ambas técnicas foi feito com os softwares Origin 2019 da OriginLab e Excel 2016 da Microsoft.

4.6 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

4.6.1 Polimento

O polimento do ECV foi uma importante etapa do método eletroquímico. O polimento gradual completo da superfície do eletrodo se deu na sequência de lixas d'água de granulometrias que variavam de 400, 600, 1200 a 2000 (números maiores indicam lixas mais suaves). A granulometria determina o tamanho do grão das lixas e, por consequência, o seu poder de desgaste, o seu valor é normalmente representado com um G maiúsculo no verso na lixa. O procedimento completo foi realizado somente em caso de extrema necessidade, devido ao alto desgaste sofrido pelo carbono vítreo.

Rotineiramente, o polimento ocorria pelo uso sequenciado das suspensões de alumina 1,00, 0,3 e 0,05 μm sobre tecido de feltro, executando movimentos “em oito” e/ou polimento em círculos com spray de diamante 1,00 μm da KEMET sobre papel qualitativo de filtro, nessa

ordem. O papel contendo spray foi submetido à secagem sob luz infravermelho. O eletrodo sempre foi lavado com jatos de água destilada entre os polimentos com alumina de diferentes granulometrias e na transição para o polimento com spray.

A limpeza eletroquímica da superfície electrocatalítica foi feita por voltametria cíclica no eletrólito de suporte HCl/KCl. Empregaram-se os seguintes parâmetros: 20 ciclos no intervalo de potencial de 0 a 1,2 V e velocidade de varredura 20 mV.s⁻¹. O procedimento foi realizado uma ou duas vezes até que o perfil da VPD estivesse adequado. Usou-se célula limpa e eletrólito de suporte novo para análise do branco e da amostra.

4.6.2 Procedimento

A VPD teve início após a limpeza eletroquímica do ECV e os parâmetros foram: velocidade de varredura de 10 mV.s⁻¹, faixa de potencial de 0 a 1,2 V, amplitude de pulso de 50 mV.s⁻¹, intervalo de pulso de 0,5s e salto de potencial de 5mV.

Primeiro, o perfil do branco ou linha de base foi obtido pela varredura de 10 mL do eletrólito de suporte ES. Em seguida, o perfil da amostra foi obtido pela adição de extrato (solução analítica da figura 8) à célula eletroquímica e diluição com ES para que a concentração e volume final fossem 50 mg/mL e 15 mL, respectivamente.

A linha de base foi subtraída do voltamograma da amostra pelo software OriginPro 9.0, obtendo-se o perfil eletroquímico da amostra, de onde foram obtidos os valores de potencial de pico I_p e corrente de pico E_p , úteis para o cálculo do índice eletroquímico IE o qual foi determinado pela equação 1:

$$IE = \left(\frac{I_{p1}}{E_{p1}} \right) + \left(\frac{I_{p2}}{E_{p2}} \right) + \dots + \left(\frac{I_{pn}}{E_{pn}} \right) \quad (1)$$

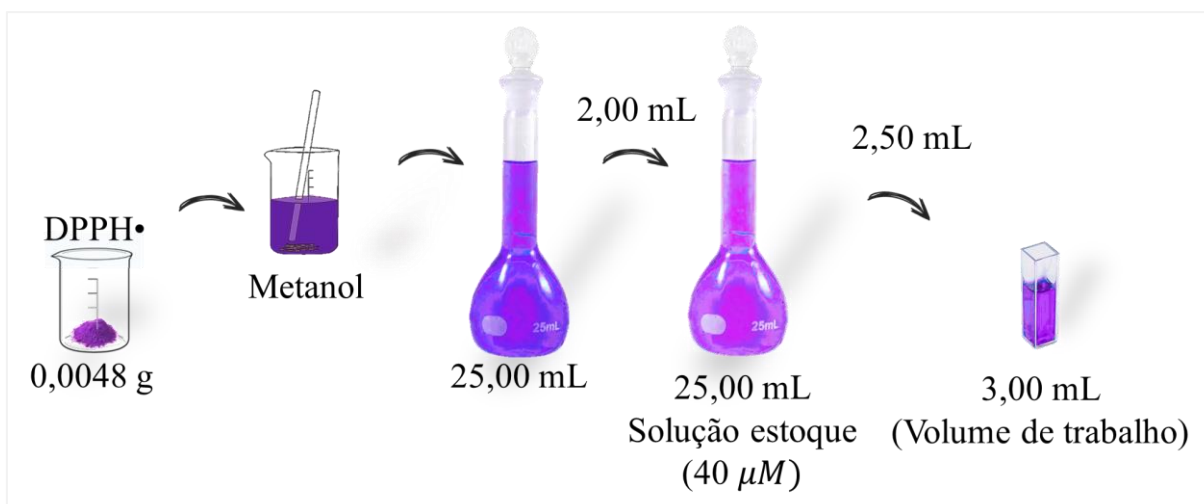
Em que, o IE equivale ao somatório da razão entre corrente de pico I_p (μ A) e potencial de pico E_p (V), até o enésimo pico obtido experimentalmente.

4.7 ENSAIO DE DPPH•

O preparo da solução estoque de DPPH• foi o primeiro passo do método espectrofotométrico, em que 0,0048g de DPPH• foram pesados e diluídos em 25 mL de metanol. Em seguida, 2 mL da solução foram diluídos em 23 mL de metanol, resultando em 25 mL (40 μ M) de solução estoque de DPPH• a ser usada nos experimentos. O extrato, por sua

vez, foi diluído em metanol e padronizado para 300 mg/mL. Todas as soluções foram protegidas da luz com papel alumínio e identificadas.

Figura 10 – Esquema de preparo da solução estoque de DPPH• e transferência da alíquota de 2,50 mL da solução para a cubeta de quartzo.



Fonte: Esquema adaptado dos sites Loja Synth¹⁷, ClipArtBest¹⁸, Prolab¹⁹ e ResinaSag²⁰.

O ensaio seguiu o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) do radical livre DPPH• em solução metanólica. A solução estoque de DPPH• foi preparada imediatamente antes dos experimentos (como representado pela figura 10) e ficou incubada no escuro durante 30 minutos, à temperatura ambiente, enquanto a absorbância foi medida a cada 5 minutos no comprimento de onda $\lambda = 516 \text{ nm}$.

Tabela 3: Concentração de extrato na cubeta de 3 mL a cada série do ensaio de DPPH•.

SÉRIE	PROPORÇÕES	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)
0	0,5 mL de MeOH + 2,5 mL de DPPH•	0,00
1	0,5 mL de extrato + 2,5 mL de DPPH•	50,00
2	0,3 mL de extrato + 2,5 mL de DPPH• + 0,2 mL de MeOH	30,00
3	0,2 mL de extrato + 2,5 mL de DPPH• + 0,3 mL de MeOH	20,00

*MeOH – metanol

Como apresentado na Tabela 3, foram feitas quatro séries de medições empregando-se concentração zero (branco) seguida de valores decrescentes (50, 30 e 20 mg/mL) de extrato na cubeta de 3 mL. O ensaio do padrão (+) – catequina empregou as concentrações 10, 6 e 4

¹⁷ Disponível em: <<https://www.lojasynth.com/vidrarias/baloes-volumetricos/balao-volumetrico-com-rolha-de-vidro>>

¹⁸ Disponível em: <<http://www.clipartbest.com/beaker-png>>.

¹⁹ Disponível em: <<https://www.prolab.com.br/produtos/acessorios-para-laboratorio/cubetas/>>

²⁰ Disponível em <<https://www.resinasag.com.br/wp-content/uploads/2019/09/fluorescente-roxo.jpg>>

Acessos em abril de 2022.

μM (equivalentes a $2,9 \times 10^{-3}$; $1,74 \times 10^{-3}$ e $1,16 \times 10^{-3}$ mg/mL respectivamente). O ensaio de DPPH• para os frutos foi feito em triplicata.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram feitas em triplicata e para tratamento dos dados empregou-se estatística descritiva pelo cálculo de média, desvio-padrão e erro percentual. Foram consideradas adequadas as medidas com erro percentual inferior ou igual a 10%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

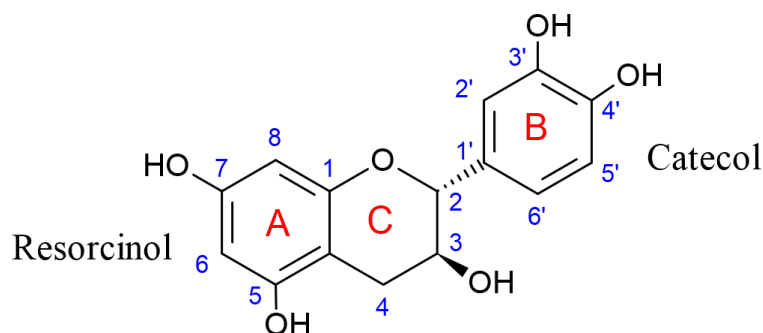
Esta seção é dividida em duas partes. **A primeira** delas é dedicada à análise dos VPD pela checagem da presença de (+) – catequina nos extratos por comparação dos potenciais de pico. O final da primeira parte estima a capacidade antioxidante das amostras pelo cálculo do índice eletroquímico *IE*. **A segunda** parte dos resultados descreve o perfil de absorbância do radical livre DPPH• na presença e ausência dos extratos em diferentes concentrações e é dedicada ao cálculo do eficiente de concentração *EC*₅₀.

5.1 ANÁLISE DOS VOLTAMOGRAMAS E OBTENÇÃO DO *IE*

Os voltamogramas gerados por VPD permitem estimar o tipo de antioxidante através dos potenciais de pico E_p e mensurar o conteúdo antioxidante natural total através do índice eletroquímico *IE*. Neste trabalho, a (+) – catequina foi usada como padrão fenólico, para comparação direta com os voltamogramas dos frutos; trata-se de um flavonóide do tipo flavanol-3-ol com alto índice eletroquímico e que ocorre abundantemente em plantas e frutos (BLASCO et al., 2005; HAQUE et al., 2021; SABAGHI et al., 2021).

A catequina já foi bastante estudada e usada como padrão em estudos comparativos de antioxidantes, segundo Sara et al. (2015) e Pacheco-Coello et al. (2019). Ações antiviral, inibidora de desordens neurológicas, anticarcinogênica e antidiabética estão associadas aos efeitos *in vivo* do composto. Enquanto, a atividade antioxidante *in vitro* da molécula se deve às suas hidroxilas, mas principalmente ao anel B (CHATTERJEE et al., 2018).

Figura 11 – Estrutura molecular da catequina contendo anéis benzênicos A (resorcinol) e B (catecol) e, um anel pirano C.

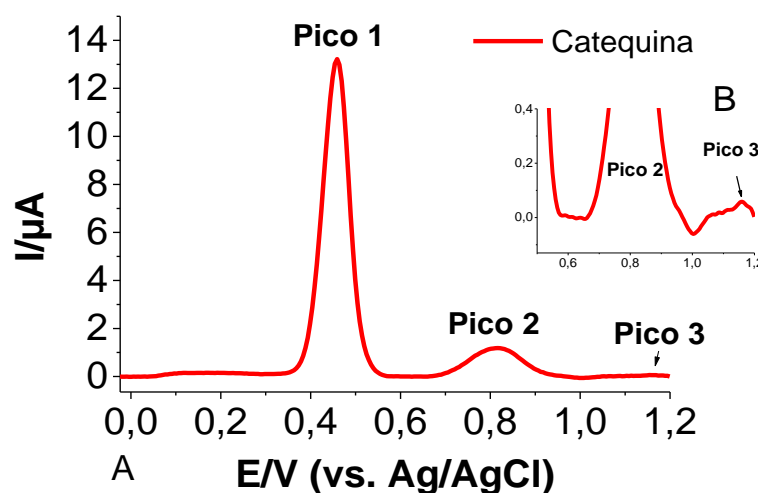


Fonte: Autoria própria.

A molécula da catequina, mostrada na figura 11 possui um anel resorcinol (A), um anel catecol (B) e um anel pirano (C) acoplado à uma hidroxila no carbono 3. O grupo 3', 4' - *dihidroxila* no anel B confere a alta capacidade antioxidante da catequina e é responsável pelo primeiro pico de oxidação, observado na VPD (MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ et al. 2010; FANG et al., 2021).

De acordo com a figura 12 A, a primeira varredura catódica da catequina a 10 μM exibiu dois picos de oxidação: o primeiro no potencial $E_{p1, \text{cat.}} = 0,45 \text{ V}$ e o segundo em $E_{p2, \text{cat.}} = 0,81 \text{ V}$. O **pico 1**, referiu-se – como visto – à oxidação do grupo 3',4' *dihidroxila* no anel B de catecol, que é característico em potenciais menores $E_p < +0.5 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl, 3 M KCl), indicando a potente ação antioxidante do grupo, de acordo com Janeiro e Brett (2004).

Figura 12 – A. Representação da VPD (—) de (+) - catequina 10 μM em tampão HCl/KCl pH 2,2. B. Pico 3 visto após ampliação da faixa de potencial de 0,6 a 1,2 V.



Fonte: Autoria Própria.

O **pico 2**, por sua vez, correspondeu à oxidação do grupo resorcinol, anel A, que ocorre em torno do potencial $E_p \sim +0,8 \text{ V}$. É comum observar um terceiro pico referente aos produtos de oxidação do resorcinol em potenciais superiores a 1,0 V. Esse pico foi observado próximo a $E_p \sim +1,2 \text{ V}$, porém, em proporção quase imperceptível. No entanto, uma ampliação do gráfico (figura 12 B) de 0,6 a 1,2 V, permitiu visualizar melhor o pico 3 (ISSAAD et al., 2017).

De acordo com Gomes et al. (2015), substâncias cujos picos ocorrem em potenciais muito positivos, ou seja, maiores que 1,0 V não são consideradas bons antioxidantes, pois sofrem oxidação com maior dificuldade. Além disso, devido ao maior potencial, esses picos oferecem pobre contribuição para o cálculo do índice eletroquímico e para a capacidade

antioxidante total, segundo Issaad et al. (2017). Diante disso, esse estudo investigou antioxidantes até o potencial 1,2V.

Os potenciais de pico obtidos por VPD para a (+) – catequina foram idênticos aos resultados de Rodrigues et al. (2019), conforme indicado na posição 3 da tabela 4. O estudo usou os mesmos parâmetros experimentais: tampão HCl/KCl pH 2,2, velocidade de 5 mV. s⁻¹ de 0 a 1,2 V em ECV *versus* Ag/AgCl, 3 M KCl. No mesmo estudo, os autores avaliaram os picos de oxidação de outros 18 padrões de flavonóides por VPD usado ECV e avaliaram o tempo de retenção por HPLC-EC.

Tabela 4: Potencial de pico de padrões fenólicos.

PADRÃO FLAVONÓLICO	E_p (V)			
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
1 - Cloreto de Delfinidina	0,50	0,60	0,90	–
2 - Cloreto de Malvidina	0,50	0,85	–	–
3 – Catequina	0,45	0,81	–	–
4 - (–)- Galato de epigallocatequina	0,60	0,95	–	–
5 - (–)- Epicatequina	0,20	0,45	0,85	–
6 - Cloreto de Kuromanina	0,68	0,77	0,94	–
7 - Cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo	0,55	0,75	0,90	–
8 - Ácido Felúrico	0,45	0,69	0,75	–
9 - Procianidina A2	0,70	0,95	–	–
10 - Hiperosídeo	0,58	–	–	–
11 - Quercetina-3-O-glucopiranosídeo	0,57	–	–	–
12 - Rutina	0,31	0,36	1,01	–
13 - Resveratrol	0,21	0,52	0,88	1,04
14 - Fisetina	0,52	0,85	–	–
15 - Morina	0,25	0,45	–	–
16 - Quercetina diidratada	0,23	0,47	0,58	–
17 - Cloreto de perlagodina	0,53	0,57	0,90	1,07
18 - Cloreto de peonidina	0,50	0,90	–	–
19 - Hesperidina	0,30	0,50	–	–

Fonte: Rodrigues et al. (2019).

Compostos fitoquímicos podem ser identificados por comparação **direta** com padrões, desde que disponíveis ou, caso não se disponha de material padrão, uma comparação **indireta** e cuidadosa com os dados da literatura pode ser aceitável, de acordo com Harbone (1998). Apesar de o método indireto estar sujeito a erros, pode ser justificado pela falta de padrões e/ou

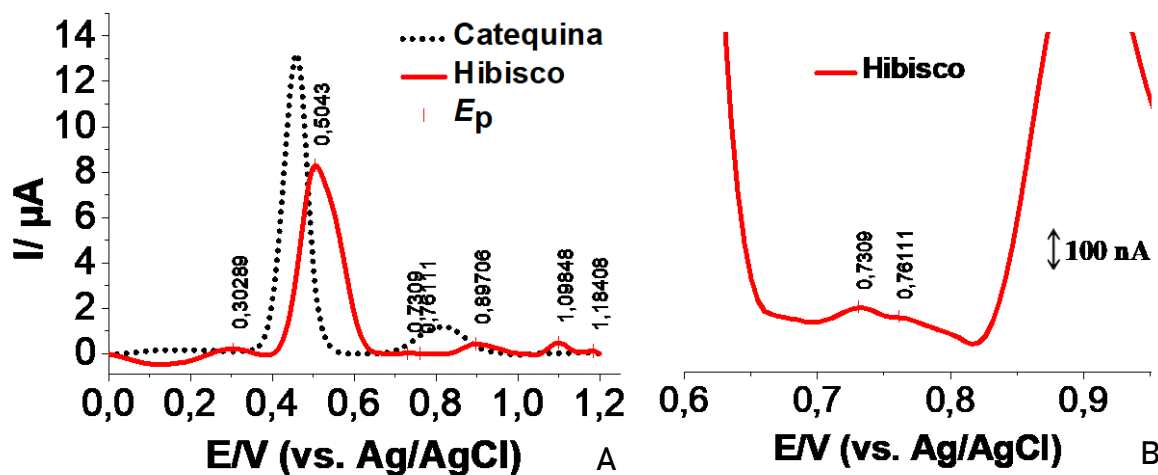
pelo trabalhoso e demorado processo de identificação (MARÇO, POPPI e SCARMINIO, 2008).

Diante da indisponibilidade de outros padrões, fez-se comparação indireta com os resultados de Rodrigues et al. (2019), tendo em vista que: (1) os parâmetros experimentais foram similares, (2) a comparação dos potenciais de catequina obtidos neste estudo com os daquela pesquisa mostrou exatidão, certificando assim a confiabilidade da comparação indireta entre os dois estudos. Dessa forma, fez-se comparação direta e/ou indireta para checar a presença de (+) – catequina e dos outros padrões, nos extratos dos frutos hibisco e pitaia.

5.1.1 Hibisco

Realizou-se voltametria de pulso diferencial para o extrato de hibisco 50 mg/mL de 0 a 1,2 V *versus* Ag/AgCl, 3 M KCl em tampão HC/KCl pH 2,2 e velocidade de varredura 10 mV. s⁻¹, como mostrado na figura 13.

Figura 13 – A. Comparação da VPD de catequina (•••) 10 μM com a voltametria de hibisco (—) 50 mg/mL em tampão HCL/KCl pH 2,2. B. Destaque dos picos em 0,73 e 0,76 V.



Fonte: Autoria própria.

Houve baixa correlação entre os E_{ps} de catequina e hibisco (figura 13), pois os picos do hibisco apresentaram deslocamento para a direita em relação aos da catequina. Possivelmente, a concentração de catequina na amostra foi baixa demais para ser detectada; pois, apesar de esse resultado sugerir a ausência de catequina, os autores Mercado-Mercado et al. (2015), Chen et al. (2013) e Vangalapati et al. (2016) identificaram o flavonóide não somente no cálice, mas também, nas folhas e sementes do HS, respectivamente.

A varredura (—) desse fruto (figura 13), exibiu pelo menos sete picos de oxidação, com os seguintes potenciais: $E_{p1, hib.} = + 0,30$ V; $E_{p2, hib.} = + 0,50$ V; $E_{p3, hib.} = + 0,73$; $E_{p4, hib.} = + 0,76$; $E_{p5, hib.} = + 0,90$ V; $E_{p6, hib.} = + 1,10$ V e $E_{p7, hib.} = + 1,18$ V. A figura 13.B permite observar os picos E_{p3} e E_{p4} com melhor nitidez. Todos os picos foram indicados na tabela 5.

Tabela 5: Correlação entre os E_{ps} de HS e dos flavonóides da tabela 4, estudados por Rodrigues et al. (2019).

Extrato de HS <i>versus</i> Flavonóides	E_p (V)						
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7
<i>Hibiscus Sabdariffa</i>	0,3	0,5	0,73	0,76	0,9	1,09	1,18
1 - Cloreto de Delfinidina	0,5	0,6	0,9	—	—	—	—
6 - Cloreto de Kuromanina	0,68	0,77	0,94	—	—	—	—
7 - Cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo	0,55	0,75	0,9	—	—	—	—
12 - Rutina	0,31	0,36	1,01	—	—	—	—
13 - Resveratrol	0,21	0,52	0,88	1,04	—	—	—
17 - Cloreto de perlagodina	0,53	0,57	0,9	1,07	—	—	—
18 - Cloreto de peonidina	0,5	0,9	—	—	—	—	—
19 - Hesperidina	0,3	0,5	—	—	—	—	—

Fonte: Rodrigues et al. (2019).

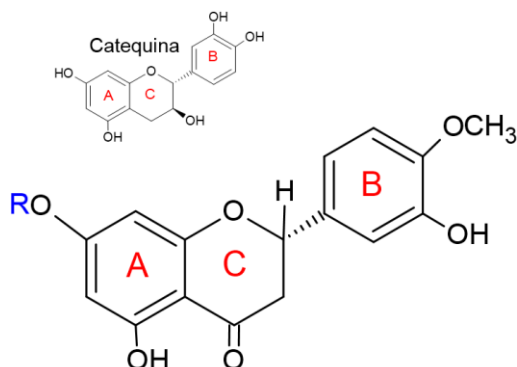
A grande quantidade de picos se deu pela presença de variados antioxidantes no extrato do hibisco, por ser uma amostra do tipo matriz complexa. Por comparação indireta com os flavonóides da tabela 4, constatou-se correlação entre os E_{ps} do hibisco e de oito fenólicos, como listados na tabela 5: cloreto de delfinidina, cloreto de kuromanin, cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo, rutina, resveratrol, cloreto de perlagodina, cloreto de peonidina e hesperidina.

Dos quais, em estudos sobre o extrato de hibisco os autores Borrás-Linares et al. (2015) constataram a presença delfinidina, Wang et al. (2014) confirmaram rutina, Idham, Muhamad e Sarmidi (2012) identificaram cloreto de kuromanina (cianidina -3- glicosídeo), El-Naeem, Abdalla e Ahmed (2021) e Amoateng et al. (2017) identificaram cloreto de perlagodina e resveratrol respectivamente em Hibisco. Apesar de não terem sido encontrados estudos sobre a presença de peonidina e peonidina-3-glucosídeo na forma de cloreto, Chaiyasut et al. (2016) verificaram a ausência de peonidina e de peonidina-3-glucosídeo no HS.

Dentre esses flavonóides, a flavanona glicosídea, hesperidina, encontrada em frutos cítricos se destacou pela excelente correlação de E_{ps} . Sua estrutura é similar à da catequina, isto é, dois anéis benzênicos A e B e um anel pirano C. Por outro lado, a hesperidina está acoplada a uma rutinose, dissacarídeo composto de uma glicose e uma raminose, suas hidroxilas ocorrem em posições diferentes daquelas da catequina, além disso ocorre um grupo metil ligado a

oxigênio (metoxi) no anel B (figura 14) (GARG *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2019; MOLDOVEANU, 2019; FERRAZ *et al.*, 2020).

Figura 14 – Estrutura da hesperidina. R = Rutinose (Glicose + Raminose).

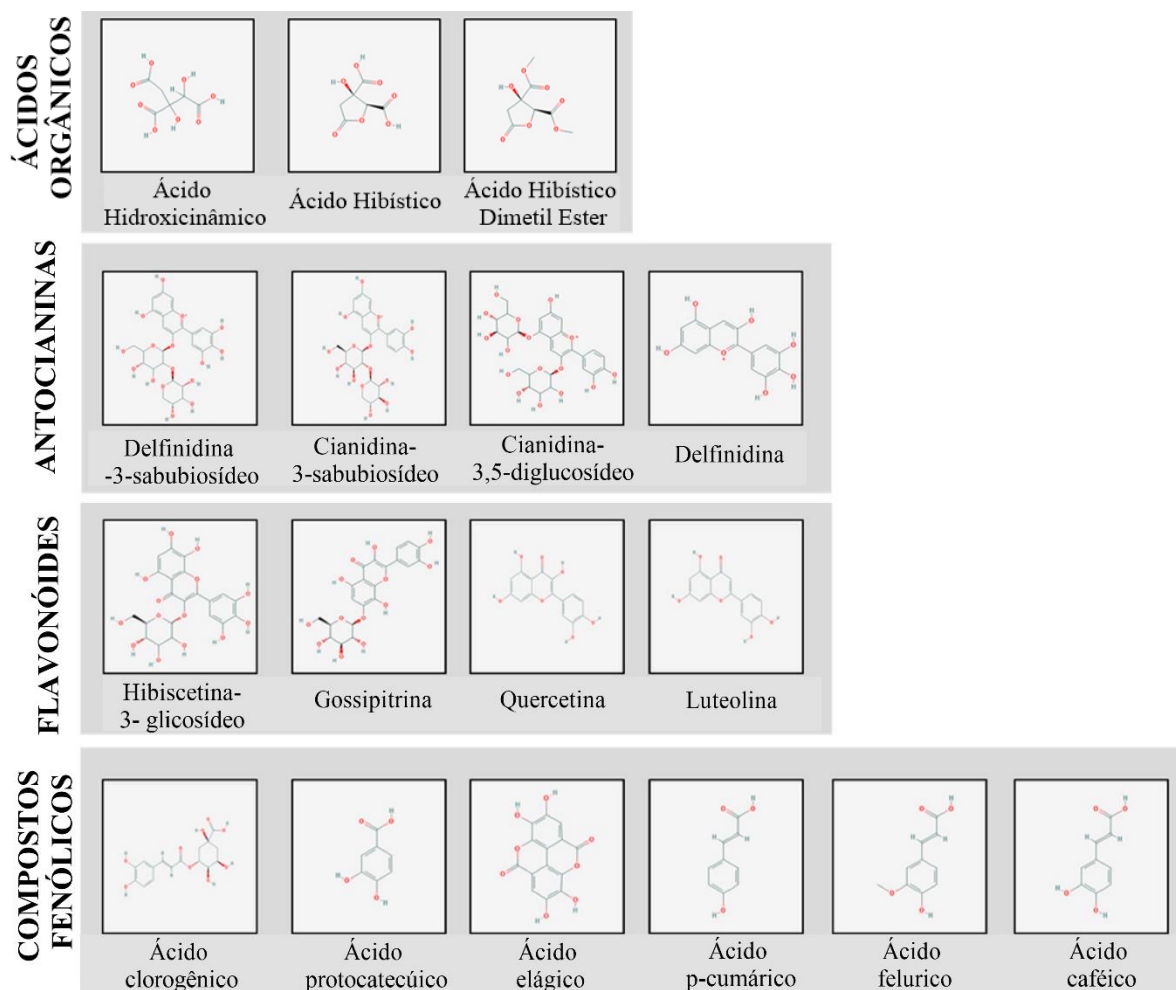


Fonte: Autoria própria.

Não foram encontrados trabalhos que confirmem a presença do flavonóide hesperidina no cálice do hibisco, como identificado aqui. Apenas Atta, Ahmed e Mohamed (2018) identificaram hesperidina, porém, não no cálice, mas no óleo das sementes do fruto. O padrão voltamétrico esperado para flavonóides como a hesperidina é um pico de oxidação maior, seguido de um pico menor. Essa sequência foi observada e é característica da respectiva oxidação dos anéis B e A (catecol e resorcinol), presentes na base estrutural dos flavonóides (figura 14) (ENACHE E OLIVEIRA-BRETT, 2011).

As quatro principais antocianinas conhecidas no cálice do hibisco são em maior proporção delphinidina-3-sambubiósido (D3S) e cianidina-3-sambubiósido (3S), e em menor proporção delphinidina-3-glucósido e cianidina-3-glucósido. Das quais, 85% do total de antocianidinas é a D3S, considerada a principal fonte de capacidade antioxidante do extrato (FREITAS *et al.*, 2013; IZQUIERDO-VEGA *et al.*, 2020).

Ojulari, Lee e Nam (2019) apresentaram as estruturas dos principais compostos bioativos do HS (1) ácidos orgânicos: ácido hidroxicítrico, ácido hibístico, ácido hibístico dimetil éster, (2) antocianinas: delphinidina-3-sambubiosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo, cianidina-3,5-diglucosídeo, delphinidina (3) flavonóides: Hibiscetina-3-glicosídeo, gossipitrina, quercetina, luteolina e (4) ácidos fenólicos: Ácido clorogênico, ácido protocatecúico, ácido elágico, ácido p-cumárico, ácido felúrico e ácido cafeico, conforme a figura 15.

Figura 15 – Estrutura dos principais compostos bioativos do *Hibiscus sabdariffa* L.

Fonte: Adaptado de Ojulari, Lee e Nam (2019).

Por fim, Alara et al. (2020) identificaram 95 flavonóides no cálice do hibisco, usando cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo (*LC-Q-TOF-MS* em inglês). A presença dos flavonóides foi confirmada porque o erro de massa pela técnica usada foi inferior a 5 ppm. Os autores destacaram, todavia, a necessidade de isolar e investigar a contribuição individual de cada componente do hibisco para as indústrias alimentícia e farmacêutica. Dessa forma, as evidências experimentais e teóricas mostraram que o hibisco é rico em antioxidantes e em outros componentes químicos (ALARA et al. 2020).

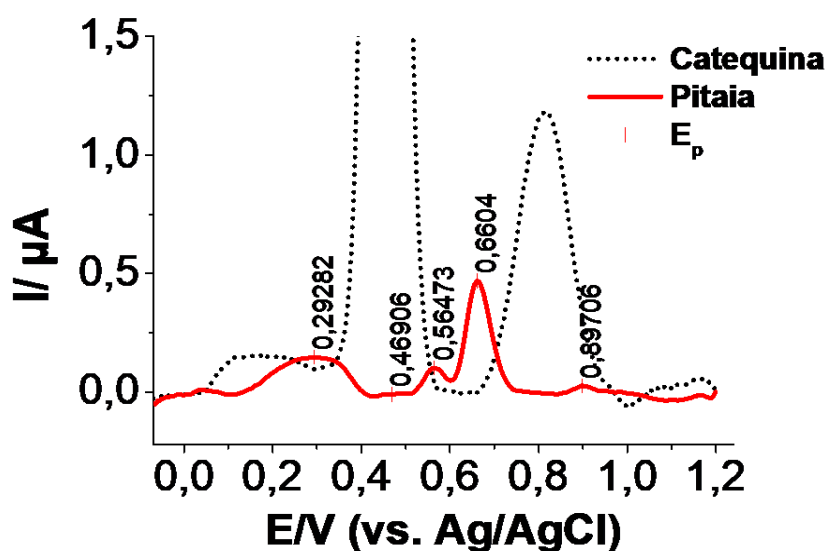
5.1.2 Pitaia

A pitaia foi analisada sob os mesmos parâmetros do hibisco e foi estimada a presença dos flavonóides: delphinidina, malvidina, catequina, (–) - galato de epigalocatequina, (–) -

epicatequina, peonidina-3-o-glicosídeo, ácido felúrico, quercetina-3-o-glucopiranosídeo, rutina, resveratrol, fisetina, quercetina, cloreto de perlagodina, cloreto de peonidina e hesperidina. Todos os fenólicos da tabela 4 mostraram correlação de pelo menos um pico E_p com a VPD da pitaia.

A voltametria da pitaia exibiu pelo menos cinco picos de oxidação: $E_{p1, pit.} = + 0,30$ V; $E_{p2, pit.} = + 0,47$ V; $E_{p3, pit.} = + 0,56$ V; $E_{p4, pit.} = + 0,66$ e $E_{p5, hib.} = + 0,90$ V, como mostrado pela figura 16. Houve discreta correlação do extrato de pitaia com a catequina, devido à ocorrência de um pico muito pequeno em $E_p = + 0,47$ V, dentro da área do pico de catequina ($E_{p1, cat.} = + 0,45$ V); não houve ocorrência de pico significativo próximo a $E_{p2, cat.} = + 0,81$ V. Apesar disso, a presença de catequina tanto na polpa, quanto na casca da pitaia vermelha foi confirmada pelos autores Huang et al. (2021) e Putriningtyas et al. (2020), respectivamente.

Figura 16 – Comparação da VPD de catequina (...) 10 μ M com a VPD da pitaia (—) 50 mg/mL em tampão HCL/KCl pH 2,2.



Fonte: Autoria própria.

Ainda sobre a figura 16, observou-se baixo sinal de corrente para o extrato de pitaia, quando comparado ao hibisco e ao padrão catequina (da figura 13), embora os extratos estivessem com a mesma concentração, isto é, 50 mg/mL. Esse comportamento, revelou uma atividade antioxidante total menor do extrato pitaia em relação ao extrato de hibisco. O sinal de corrente deste último foi consideravelmente alto, assim como o sinal da catequina (10 μ M), como já discutido.

Tabela 6: Correlação entre os E_{ps} de pitaia e dos flavonóides da tabela 4.

PADRÃO FLAVONÓLICO	E_p (V)				
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	
Pitaia	0,30	0,47	0,56	0,66	0,90
1 - Cloreto de Delfinidina	0,50	0,60	0,90	–	–
2 - Cloreto de Malvidina	0,50	0,85	–	–	–
3 – Catequina	0,45	0,81	–	–	–
4 - (–)- Galato de epigallocatequina	0,60	0,95	–	–	–
5 - (–)- Epicatequina	0,20	0,45	0,85	–	–
6 - Cloreto de Kuromanina	0,68	0,77	0,94	–	–
7 - Cloreto de peonidina-3-O-glicosídeo	0,55	0,75	0,90	–	–
8 - Ácido Felúrico	0,45	0,69	0,75	–	–
9 - Procianidina A2	0,70	0,95	–	–	–
10 - Hiperosídeo	0,58	–	–	–	–
11 - Quercetina-3-O-glucopiranosídeo	0,57	–	–	–	–
12 - Rutina	0,31	0,36	1,01	–	–
13 - Resveratrol	0,21	0,52	0,88	1,04	–
14 - Fisetina	0,52	0,85	–	–	–
15 - Morina	0,25	0,45	–	–	–
16 - Quercetina diidratada	0,23	0,47	0,58	–	–
17 - Cloreto de perlagodina	0,53	0,57	0,90	1,07	–
18 - Cloreto de peonidina	0,50	0,90	–	–	–
19 - Hesperidina	0,30	0,50	–	–	–

Fonte: Rodrigues et al. (2019).

A comparação indireta com os flavonóides da tabela 4, permitiu estimar no extrato do fruto, a presença dos flavonóides listados na tabela 6. Dos quais, em estudos sobre extrato de pitaia vermelha, Huang et al. (2021) atestaram a presença de catequina, quercetina, epicatequina, galato de epigallocatequina, ácido felúrico e rutina. Ravichandran et al. (2021) confirmaram resveratrol nas formas 4-fenil resveratrol e fitoalexina resveratrol, em extrato à base de acetona e etanol. Angonese et al. (2021) constataram a presença de hesperidina na polpa de pitaia vermelha com extração por metanol.

Não foram encontrados estudos com cloreto de kuromanina, morina, hiperosídeo e nem com os cloretos de peonidina, delfinidina, malvidina e perlagodina, mas Chaiyasut et al. (2016) comprovaram a presença das formas peonidina 3-glucosídeo, delfinidina 3-glucosídeo e malvidina 3-glucosídeo; enquanto Saenjum, Pattananandecha e Nakagawa (2021) confirmaram perlagodina 3-glicosídeo. Não foram encontrados estudos com procianidina A2, mas Morais et al. (2019) confirmaram procianidina B1 e B2. Haroun, Khirstova e Covington

(2013) confirmaram a ausência de fisetina na pitáia em sistema de solvente acetona-propapól-água.

A pitáia vermelha conta com a presença de pelo menos 11 ácidos fenólicos, 9 flavonóides, de 5 antocianinas, de acordo com Huang et al. (2021); além de fenilpropanóides e betaláínas, segundo Barkociová et al. (2021). Em um estudo genético entre pitáias brancas e vermelhas, Xi et al. (2019) esclareceu que nas vermelhas a expressão biosintética de antocianinas, foi inferior à biosíntese de betaláínas e, que a biossíntese de betaláínas foi superior nas pitáias vermelhas em comparação com aquelas de polpa branca, mostrando que a cor rubra da polpa se deve majoritariamente às betaláínas e não às antocianinas.

A determinação analítica de compostos fenólicos em amostras vegeais é relevante não somente para aplicações medicinais, mas é relevante também para (1) controle de qualidade em amostras comerciais por comparação com materiais de referência; (2) em tecnologia de alimentos e (3) na análise da influência do processamento sobre a estabilidade dos compostos fenólicos em matrizes vegeais (GRANATO et. al, 2018). A eletroquímica permitiu tanto investigar o comportamento dos CFs, quanto estimar a composição fenólica no extrato metanólico dos frutos avaliados (GIL e COUTO, 2013).

5.1.3 Obtenção do índice eletroquímico *IE*

O *IE* expressa a capacidade antioxidante total (CaT) *in vitro* de produtos naturais e foi calculado a partir dos potenciais e correntes de pico E_p e I_p fornecidos pela VPD de cada amostra, conforme a equação 1, $IE = (I_{p1}/E_{p1}) + (I_{p2}/E_{p2}) + \dots + (I_{pn}/E_{pn})$. Os resultados para as amostras de catequina, hibisco e pitáia foram respectivamente 33,97 $\mu\text{A/V}$; $18,35 \pm 0,11\mu\text{A/V}$ e $1,36 \pm 0,06 \mu\text{A/V}$. Mostrando que a maior CaT foi para a catequina, seguida do hibisco e a menor CaT foi para a pitáia.

A tabela 7 exhibe os valores de E_p , I_p , e *IE* calculados e, um desvio menor que 10% para os frutos. Dentre os três, a catequina apresentou o maior valor de *IE* de 33,97 $\mu\text{A/V}$. Esse valor foi superior ao *IE* de catequina encontrado por Rodrigues et al. (2019) $IE = 0,206 \text{ nA/mV}$ (10 μM) em pH 2,2; e, superior ao valor encontrado por Gomes et al. (2015) $IE = 4,001 \mu\text{A/V}$ (10 μM) em pH 1,9. Compostos fenólicos com boa capacidade antioxidante *in vitro* apresentam alta corrente de pico em potenciais baixos $E_p < +0.45 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), assim como observado para a catequina neste trabalho (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2020).

Tabela 7: Dados experimentais de E_p e, I_p para a VPD dos extratos (50 mg/mL) de hibisco e pitaia e do padrão catequina (10 μ M). Índice eletroquímico (IE) apresentado na última coluna.

Amostra	E_p (V)					I_p (μ A)					IE (μ A/V)
Catequina	0,45	0,81	-	-	-	14,7	0,99	-	-	-	33,97
Hibisco	0,30	0,50	0,90	1,10	1,18	0,21	8,30	0,43	0,47	0,12	18,35 \pm 0,11
Pitaia	0,30	0,56	0,66	0,90	-	0,15	0,10	0,47	0,03	-	1,36 \pm 0,06

Fonte: Autoria própria.

O índice eletroquímico do hibisco foi de 18,35 \pm 0,11 μ A/V com um desvio de apenas 0,61% entre os valores da triplicata. De acordo com esse resultado, o hibisco apresentou alta capacidade antioxidante, atingindo pouco mais da metade da CaT da catequina. O IE da pitaia foi 1,36 \pm 0,06 com desvio menor que 5% da triplicata. De acordo com esse resultado, a capacidade antioxidante da pitaia foi consideravelmente baixa.

O IE permite quantificar não compostos fenólicos separadamente, mas sim a contribuição de todos os antioxidantes detectáveis na amostra. Portanto, sob as mesmas condições experimentais e com base no índice eletroquímico, o Hibisco apresentou maior capacidade antioxidante total *in vitro* em comparação com a pitaia vermelha e com o padrão catequina. Esses resultados permitem avaliar a qualidade dos frutos, mas por si só não permitem tirar conclusões sobre a atividade *in vivo* desses antioxidantes (GRANATO et al., 2018).

5.2 ANÁLISE DA ABSORBÂNCIA E OBTENÇÃO DO EC₅₀

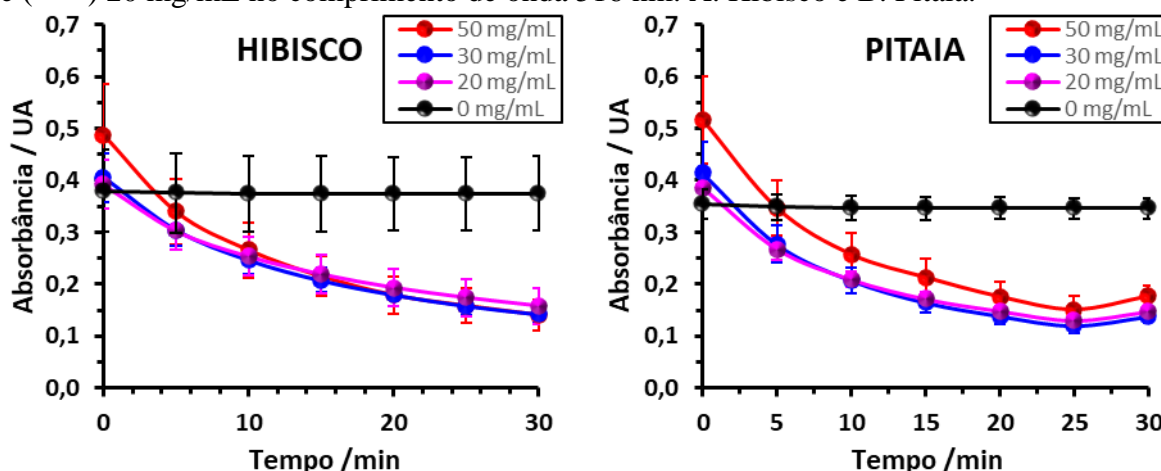
Esta segunda parte dos resultados descreve o perfil de absorbância do DPPH• na ausência e na presença de três concentrações de extrato, assim como o perfil da média de absorbância do DPPH• para o hibisco e para a pitaia. Essa discussão ocorreu com base nos gráficos obtidos. Por último, o EC₅₀ foi calculado e o seu valor, discutido e comparado com o IE dos dois frutos e da catequina.

5.2.1 Análise do perfil de absorbância por concentração de extrato

Métodos de estudo redox *in vitro* avaliam a transferência de um átomo de hidrogênio (HAT), transferência de um único elétron (SET) ou transferência sequencial de elétron e próton (SPLET). O ensaio de DPPH• abrange os três mecanismos porque tanto um átomo quanto um elétron recebido podem estabilizar a molécula de DPPH• de forma sequencial ou não, como elucidado por Angonese et al. (2021).

No ensaio de DPPH•, observou-se que quanto maior a concentração do extrato, mais acentuado foi o decaimento da absorbância. Tratou-se de um perfil redox esperado, uma vez que a maior concentração/qualidade de antioxidante gerou maior redução do radical livre DPPH• e conseqüente perda da coloração violeta. A variação colorimétrica - perda da cor violeta - ocasionou a diminuição dos valores de absorbância (HAQUE et al., 2021).

Figura 17 – Decaimento de absorbância do radical livre DPPH• (40 μ M) na ausência (—●—) 0 mg/mL e na presença de extrato a diferentes concentrações: (—●—) 50 mg/mL, (—●—) 30 mg/mL e (—●—) 20 mg/mL no comprimento de onda 516 nm. A. Hibisco e B. Pitaia.



Fonte: Autoria própria.

As figuras 17 A e B mostram o decaimento das absorbâncias de DPPH• na ausência e na presença de três concentrações de extratos de hibisco (17 A) e de pitaia (17 B). Essas figuras evidenciaram que na ausência de antioxidante (—●—) 0 mg/mL, não houve variação significativa de absorbância, durante o intervalo de ensaio; e que para os dois frutos, a tendência de decaimento foi maior para (—●—) 50 mg/mL, média para (—●—) 30 mg/mL e sutilmente inferior para (—●—) 20 mg/mL, evidenciando a dependência direta entre concentração da amostra e inibição do DPPH• (SIRAG et al., 2014).

Ambos os extratos apresentaram cinética similar com queda de absorbância ligeiramente maior nos primeiros cinco minutos; seguida de reação mais lenta entre 5 e 30 minutos, envolvendo a degradação dos produtos, até que o equilíbrio fosse atingido (GOMES et al., 2016). Flavonóides como hesperidina e rutina podem doar átomos de hidrogênio e elétrons desemparelhados (GULCIN et al., 2020).

A presença de grupo catecol (anel B) e de grupo 4-oxo tem grande influência na deslocalização de elétrons; e a disposição das hidroxilas ao longo da molécula determina a habilidade sequestradora de radicais dos flavonóides e, sua capacidade de atuar pelos mecanismos SET, HAT e SPLET (GULCIN et al., 2020; ANGONESE et al., 2021).

5.2.2 Cálculo do eficiente de concentração EC₅₀

O EC₅₀ representa a concentração de antioxidante *in vitro* necessária para reduzir em 50% a concentração de DPPH• inicial, através da transferência de elétrons do antioxidante para o radical livre. O menor valor de EC₅₀ indica a forte capacidade antioxidante da amostra, de acordo com Harzallah et al. (2016) (GOMES et al, 2016).

Tabela 8: Dados do ensaio de DPPH• para a (+) – catequina.

Catequina					
	0 μM	10 μM	6 μM	4 μM	
Tempo (min)	0 mg/mL	2,9x10⁻³ mg/mL	1,74x10⁻³ mg/mL	1,16 x10⁻³ mg/mL	Média geom.
0	0,36	0,17	0,25	0,29	0,26
5	0,36	0,07	0,17	0,26	0,18
10	0,36	0,03	0,14	0,24	0,14
15	0,36	0,03	0,12	0,23	0,13
20	0,36	0,03	0,10	0,22	0,12
25	0,36	0,03	0,09	0,22	0,12
30	0,36	0,02	0,09	0,21	0,11
Média geom.	-	0,04	0,13	0,24	-

Fonte: Autoria própria.

Os ensaios de DPPH• para o hibisco e pitaia ocorreram em triplicata, totalizando seis experimentos, em que foram usados 50, 30 e 20 mg/mL em concentração de extrato. Esses resultados encontram-se registrados (tabelas 10 a 15) no apêndice B ao final deste trabalho, conforme o modelo da tabela 8. A tabela 8 é referente ao padrão (+) – catequina. Esses dados foram a base para a construção dos gráficos das figuras 17 A, 17 B; e, para o cálculo do EC₅₀.

A tabela 8 exibe os valores de absorvância coletados de 5 em 5 minutos sob comprimento de onda 516 nm. Em que, foram usadas concentrações 10, 6 e 4 μM (2,9x10⁻³; 1,74x10⁻³ e 1,16x10⁻³ mg/mL respectivamente) de catequina. A última coluna (à direita) apresenta as médias geométricas de absorvância nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos; a última linha mostra a média geométrica de cada concentração, esses valores foram usados para o cálculo do EC₅₀.

$$EC_{50} = \frac{(A_0/2) * \bar{C}_{Ext}}{\bar{A}_1} \quad (10)$$

Utilizou-se a equação 10 para o cálculo do EC₅₀; em que A₀ é a absorvância na ausência de antioxidante, \bar{C}_{Ext} é a média das três concentrações de extrato 50, 30 e 20 mg/mL e \bar{A}_1 representa a média aritmética das médias geométricas de absorvância em (50, 30 e 20 mg/mL),

conforme indicado na linha inferior da tabela 8 (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSSET, 1995; RODRIGUES, 2019).

Tabela 9: Valores dos EC_{50} obtidos para hibisco e pitaia por ensaio de DPPH•.

Amostras	EC_{50} (mg/mL)
Catequina	$2,73 \times 10^{-3}$
Hibisco	$28,24 \pm 2,07$
Pitaia	$29,69 \pm 0,71$

Fonte: autoria própria.

A tabela 9 apresentou os valores de EC_{50} calculados para o hibisco, pitaia e (+) – catequina. Comparando os três valores de EC_{50} , pode-se observar que a capacidade antioxidante do hibisco foi superior àquela da pitaia, pois seu valor de EC_{50} foi menor (EC_{50} Hib. = $28,24 \pm 2,07$ mg/mL) em comparação com o valor da pitaia (EC_{50} Pit. = $29,69 \pm 0,71$ mg/mL). Sirag et al. (2014) realizaram uma comparação entre *IE* e EC_{50} do hibisco e (+) - catequina e obtiveram o mesmo padrão de resultado.

Enquanto, o *IE* dos frutos apresentou grande variação, o EC_{50} praticamente não variou de um fruto para o outro. Esse comportamento indicou que a sensibilidade pela técnica eletroquímica foi muito maior que aquela obtida por espectrofotometria. Assim, ficou demonstrada a excelente sensibilidade da detecção eletroquímica e sua adequação para detectar os compostos fenólicos em extrato de frutos, assim como observado por Gomes et al. (2016).

O presente estudo, portanto, permitiu avaliar por EC_{50} a capacidade antioxidante dos dois frutos e mostrou que (1) a maior capacidade antioxidante ocorreu para o hibisco e (2) que a CaT da pitaia foi bem inferior. Por outro lado, o menor EC_{50} da catequina esteve de acordo com sua maior capacidade antioxidante; em concordância, os frutos com maior *IE* exibiram o menor EC_{50} . Assim, os resultados espectrofotométricos, estiveram de acordo os resultados do estudo eletroquímico por voltametria de pulso diferencial.

6 CONCLUSÃO

A técnica eletroquímica VPD e o ensaio espectrofotométrico de DPPH• permitiram determinar, através do cálculo de IE e do EC₅₀, a capacidade antioxidante dos frutos vermelhos hibisco e pitaia e do padrão catequina. A análise dos voltamogramas permitiu ainda estimar e sugerir com base na literatura a presença da catequina e de outros flavonóides nas amostras de fruto.

Obteve-se boa correlação entre os resultados de EC₅₀ e IE, que são valores inversamente proporcionais, conforme Chiorcea-Paquim et al., (2020). Em ambos os métodos a CaT do padrão catequina foi superior à dos frutos. Enquanto, a comparação entre os frutos indicou: alta CaT para o hibisco, cujo IE foi maior e EC₅₀, menor; e, baixa CaT para a pitaia, cujo IE foi menor e EC₅₀, maior. Isso mostrou que a determinação do IE e EC₅₀ é uma alternativa rápida, precisa e de baixo custo para avaliar a capacidade antioxidante total em amostras vegetais.

Os métodos foram aplicados com sucesso na determinação da CaT e análise qualitativa do conteúdo flavonólico; e se mostraram precisos com erros inferiores a 8% e 5% para o DPPH• e VPD, respectivamente. De acordo com Granato et al. (2018), seria apropriado incluir estudos biológicos *in vitro*, digestão simulada e/ou ensaios *in vivo* para concreta aplicação medicinal; esses métodos, porém são mais caros. Todavia, os métodos usados mostraram efetividade na análise *in vitro* da CaT de frutos, podendo ser aplicados em análise de rotina, útil para indústria alimentícia e para comercialização (GOMES et al., 2016).

7 REFERÊNCIAS

- ABD GANI, Siti Salwa; VIJAYAKUMAR, Ramya; MOKHTAR, Nor Fadzillah Mohd. New Trends in Cosmetics: the Potential Use of Red Pitaya and Its By-Products As Cosmetic Active Ingredients. **Journal of Mechanics of Continua and Mathematical Sciences**, spl9 (1), p. 138-148, 2020.
- ABOU BAKER, Doha H. An ethnopharmacological review on the therapeutical properties of flavonoids and their mechanisms of actions: A comprehensive review based on up to date knowledge. **Toxicology Reports**, 2022.
- ADWAS, Almohktar A. et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **J. Appl. Biotechnol. Bioeng**, v. 6, n. 1, p. 43-47, 2019.
- AINA, Temilola et al. Anti-proliferative Activity of Hibiscus sabdariffa L. Calyx Flavonoid Extracts on Cervical Cancer Cells using Flow Cytometry. **Pharmacognosy Communications**, v. 11, n. 2, 2021.
- ALARA, Oluwaseun R. et al. Extract-rich in flavonoids from Hibiscus sabdariffa calyces: Optimizing microwave-assisted extraction method and characterization through LC-Q-TOF-MS analysis. **Journal of Food Process Engineering**, v. 43, n. 2, p. e13339, 2020.
- ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200-214, 2021.
- ALBUQUERQUE, Bianca R. et al. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.
- ALEIXO, Luiz Manoel. Voltametria: conceitos e técnicas. **Chemkeys**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, p. 1-40, 2003.
- ALI, Alia Hussein et al. The effect of ethanolic extract of Hibiscus sabdariffa on some physiological and antioxidant parameters in female rabbits. **Journal of Animal Health and Production**, v. 4, p. 37-41, 2016.
- ALI, B. H.; MOUSA, H. M.; EL-MOUGY, S. The effect of a water extract and anthocyanins of hibiscus sabdariffa L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 17, n. 1, p. 56-59, 2003.
- AMOATENG, Kennedy et al. Antimicrobial activity of Hibiscus sabdariffa extract against bacteria. **Annals of Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, n. 2, 2017.
- ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ANGONESE, Mariana et al. Organic dragon fruits (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*) grown at the same edaphoclimatic conditions: Comparison of phenolic and organic acids profiles and antioxidant activities. **LWT**, v. 149, p. 111924, 2021.

ATTA, Nahed MM; AHMED, Azza AA; MOHAMED, Enaam Sh A. Quality Attributes of Hibiscus Seed Oil Compared with Soybean Oil. **Journal of Food and Dairy Sciences**, v. 9, n. 11, p. 359-363, 2018.

ATTAR, Şule Hilal et al. Nutritional Analysis of Red-Purple and White-Fleshed Pitaya (Hylocereus) Species. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 808, 2022.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARKOCIOVÁ, Michaela et al. Betalains in Edible Fruits of Three Cactaceae Taxa—Epiphyllum, Hylocereus, and Opuntia—Their LC-MS/MS and FTIR Identification and Biological Activities Evaluation. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2669, 2021.

BELLUCCI, Elisa Rafaela Bonadio et al. Red pitaya extract as natural antioxidant in pork patties with total replacement of animal fat. **Meat Science**, v. 171, p. 108284, 2021.

BERHANU, S.; TADESSE, D. M.; JORGE, A. Physico-chemical properties of Ethiopian Apis mellifera Honey: Review. **J Agric Sc Food Technol**, v. 8, n. 1, p. 038-044, 2022.

Ben-Erik van Wyk (2014). **Culinary Herbs and Spices of the World**. University of Chicago Press. p. 146.

BIELA, Monika et al. Antioxidant action of deprotonated flavonoids: Thermodynamics of sequential proton-loss electron-transfer. **Phytochemistry**, v. 180, p. 112528, 2020.

BLASCO, Antonio J. et al. “Electrochemical Index” as a screening method to determine “total polyphenolics” in foods: A proposal. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p. 237-244, 2005.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, v. 181, n. 4617, p. 1199- 1200, 1958.

BORRÁS-LINARES, I. et al. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (Hibiscus sabdariffa). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385-394, 2015.

BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUDI, Setia; SULIASIH, B. Asih; TAWWABIN, Rizqi Aulia. Comparative evaluation of antioxidant activity in honey. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publing LLC, 2021. p. 060001.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: **I Seminário Internacional de Vitivinicultura**. Anais. Ensenada, México, 2003.

CHAIYASUT, Chaivavat et al. Anthocyanin profile and its antioxidant activity of widely used fruits, vegetables, and flowers in Thailand. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 6, p. 218-224, 2016.

CHATTERJEE, Trisita Nandy et al. Molecular imprinted polymer based electrode for sensing catechin (+ C) in green tea. **IEEE Sensors Journal**, v. 18, n. 6, p. 2236-2244, 2018.

CONG-CONG, X. U. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese journal of natural medicines**, v. 15, n. 10, p. 721-731, 2017.

CHEN, Jing-Hsien et al. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR α /ABCA1 pathway. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 397-406, 2013.

CHIORCEA-PAQUIM, Ana-Maria et al. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1680-1726, 2020.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v.854, p.435-442, 1998.

DE ABREU PINHEIRO, Flávia et al. Influence of the extraction process on the antioxidant capacity of pequi pulp extracts. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e498101220663-e498101220663, 2021.

DE ARAÚJO SILVA, Matheus Merson et al. Hibiscus sabdariffa L.–Atividades Biológicas e Terapêuticas: Uma Revisão, 2018.

DUBOIS-DERUY, Emilie et al. Oxidative stress in cardiovascular diseases. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 864, 2020.

EL-NAEEM, Arwa; ABDALLA, Sahar; AHMED, Ibrahim. New Identified Anthocyanins from Sudanese Roselle: Potential Candidates for inhibition of Xanthine Oxidase. 2021.

ENACHE, Teodor Adrian; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 9-16, 2011.

FANG, Zhongyi et al. Improving Fenton-like system with Catechin, an environmental-friendly polyphenol: Effects and mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 426, p. 127946, 2021.

FANG, Yajing et al. Structure affinity relationp and docking studies of flavonoids as substrates of multidrug-resistant associated protein 2 (MRP2) in MDCK/MRP2 cells. **Food chemistry**, v. 291, p. 101-109, 2019.

FERRAZ, Camila R. et al. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 762, 2020.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREITAS, Nélio Martins; SANTOS, Angela Maria Correa Mouzinho; MOREIRA, Lucy Rose de Maria Oliveira. Avaliação fitoquímica e determinação de minerais em amostras de *Hibiscus sabdariffa* L (vinagreira). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n. 3, p. 65-72, 2013.

GARG, A. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.

GIL, Eric S.; COUT, René O. Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 542-558, 2013.

GIOVAGNOLI-VICUÑA, Claudia et al. A square wave voltammetry study on the antioxidant interaction and effect of extraction method for binary fruit mixture extracts. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.

GOMES, Sara MC et al. *Calligonum polygonoides linnaeus* extract: HPLC-EC and total antioxidant capacity evaluation. **Electroanalysis**, v. 27, n. 2, p. 293-301, 2015.

GOMES, Sara MC et al. Flavonoids electrochemical detection in fruit extracts and total antioxidant capacity evaluation. **Talanta**, v. 154, p. 284-291, 2016.

GONZÁLEZ-BURGOS, Elena; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. Pilar. Effect of phenolic compounds on human health. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3922, 2021.

GRANATO, Daniel et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. **Food chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.

GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

GUSMAN, J.; MALONNE, H.; ATASSI, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, v. 22, n. 8, p. 1111-1117, 2001

HACKE, Ana Carolina Mendes et al. Antioxidant capacity of *Myrciaria cauliflora* seed extracts by spectrophotometric, biochemical, and electrochemical methods and its protective effect against oxidative damage in erythrocytes. **Journal of Food Biochemistry**, p. e14222, 2022.

HAQUE, Md Azizul et al. Electrochemical methods to evaluate the antioxidant activity and capacity of foods: A review. **Electroanalysis**, v. 33, n. 6, p. 1419-1435, 2021.

HARBORNE, A. J. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis**. Springer science & business media, 1998.

HAROUN, Mahdi; KHIRSTOVA, Palmina; COVINGTON, Tony. Tannins characterization of some indigenous and exotic woody plant species and two agricultural crops in Sudan. **Journal of Forest Products & Industries**, v. 6, p. 38-46, 2013.

HARZALLAH, Arij et al. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs (*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 255-267, 2016.

HOYOS-ARBELÁEZ, Jorge; VÁZQUEZ, Mario; CONTRERAS-CALDERÓN, José. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. *Food Chemistry*, v. 221, p. 1371-1381, 2017.

HUANG, Yanyi et al. Maturation process, nutritional profile, bioactivities and utilisation in food products of red pitaya fruits: A review. **Foods**, v. 10, n. 11, p. 2862, 2021.

HUSAIN, S. Rafat; CILLARD, Josiane; CILLARD, Pierre. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.

IDHAM, Zuhaili; MUHAMAD, Ida Idayu; SARMIDI, Mohd Roji. DEGRADATION KINETICS AND COLOR STABILITY OF SPRAY-DRIED ENCAPSULATED ANTHOCYANINS FROM HIBISCUS SABDARIFFA L. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, n. 4, p. 522-542, 2012.

INGALLINA, Cinzia et al. Chemico-biological characterization of torpedino di Fondi® tomato fruits: a comparison with San Marzano cultivar at two ripeness stages. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 1027, 2020.

ISSAAD, Fatima Zohra et al. Flavonoids in selected mediterranean fruits: Extraction, electrochemical detection and total antioxidant capacity evaluation. **Electroanalysis**, v. 29, n. 2, p. 358-366, 2017.

IWANA, Tsukasa. Contribution to flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. **Natural product communications**, v. 10, n. 3, p. 1934578X1501000335, 2015.

IZQUIERDO-VEGA, Jeannett A. et al. Organic acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)—A brief review of its pharmacological effects. **Biomedicines**, v. 8, n. 5, p. 100, 2020.

JANEIRO, Patricia; BRETT, Ana Maria Oliveira. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica chimica acta**, v. 518, n. 1-2, p. 109-115, 2004.

JANSON, Benjarat et al. Hibiscus sabdariffa L. calyx extract prevents the adipogenesis of 3T3-L1 adipocytes, and obesity-related insulin resistance in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111438, 2021.

KARAK, Prithviraj. Biological activities of flavonoids: an overview. **Int. J. Pharm. Sci. Res**, v. 10, n. 4, p. 1567-1574, 2019.

KAWSAR, M. et al. In-vitro and in-vivo models for antioxidant activity evaluation: a review. **Journal of SUB**, v. 5, p. 21-31, 2014.

KEDARE, Sagar B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH• method of antioxidant assay. **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

LAURA, A. et al. Phenolic compounds. In: **Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables**. Woodhead Publing, 2019. p. 253-271.

LINO, F. M. A. et al. Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. **Electrochimica Acta**, v. 128, p. 25-31, 2014.

LONE, Alessandro Borini et al. Temperatura na germinação de sementes de genótipos de pitaya. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2251-2257, 2014.

LONE, Alessandro Borini; TAKAHA, Lúcia Assari Sadayo; DE FARIA, Ricardo Tadeu. Influência dos diferentes tipos de pólen sobre a qualidade do fruto de pitaya. **Agropecuária Catarinense**, v. 30, n. 2, p. 51-53, 2017.

LOURENÇO, Sofia C.; MOLDÃO-MARTINS, Margarida; ALVES, Vítor D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132, 2019.

MAGANHA, Elemar Gomes et al. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus. **Food chemistry**, v. 118, n. 1, p. 1-10, 2010.

MAJDOUB, Yassine Oulad El et al. Evaluation of the availability of delphinidin and cyanidin-3-O-sambubioside from Hibiscus sabdariffa and 6-gingerol from Zingiber officinale in colon using liquid chromatography and mass spectrometry detection. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 11, p. 2425-2433, 2019.

MARCUCCI, Maria Cristina et al. Espectroscopia UV-VIS e reação com o radical DPPH para a detecção de flavonoides e determinação do potencial antioxidante de extratos de própolis. **Revista Eletrônica de Ciências Exatas**, v. 1, n. 1, 2020.

MÁRQUEZ-RODRÍGUEZ, Ana Selene et al. In vitro antibacterial activity of Hibiscus sabdariffa L. phenolic extract and its in situ application on shelf-life of beef meat. **Foods**, v. 9, n. 8, p. 1080, 2020.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Pedro et al. Health-promoting potential of betalains in vivo and their relevance as functional ingredients: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2022.

MARÇO, Paulo Henrique; POPPI, Ronei Jesus; SCARMINIO, Ieda Spacino. PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS PRESENTES EM EXTRATOS NATURAIS. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, Martina et al. Electrochemical and antioxidant properties of (+)-catechin, quercetin and rutin. **Croatica chemica acta**, v. 83, n. 2, p. 197-207, 2010.

MERCADO-MERCADO, Gilberto et al. Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.). **Journal of functional foods**, v. 18, p. 171-181, 2015.

MOHAMMADI, Masoumeh. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: a brief review. **International journal of preventive medicine**, v. 10, 2019.

MOLDOVEANU, Serban C. Pyrolysis of organic molecules. In: **Pyrolysis of Other Nitrogen-Containing Compounds**. 2019.

MOLYNEUX, Philip et al. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. sci. technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MORAIS, Suênia Gabriela Gonçalves et al. Effects of probiotics on the content and bioaccessibility of phenolic compounds in red pitaya pulp. **Food research international**, v. 126, p. 108681, 2019.

MORILLO-CORONADO, Ana Cruz; MANJARRES HERNÁNDEZ, Elsa Helena; FORERO-MANCIPE, Lucimar. Phenotypic Diversity of Morphological Characteristics of Pitahaya (Selenicereus Megalanthus Haw.) Germplasm in Colombia. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2255, 2021.

MUTHA, Rakesh E.; TATIYA, Anilkumar U.; SURANA, Sanjay J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. **Future journal of pharmaceutical sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2021.

NASCIMENTO, Juliana Couto et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH• e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

NETO, Joaquim Maria Ferreira Antunes; NALESSO, Ana Maria. Papel do estresse oxidativo na etiologia da esquizofrenia: revisão sistemática. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 19214-19232, 2021.

OLIVEIRA, George Layson da Silva. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

OJULARI, Oyindamola Vivian; LEE, Seul Gi; NAM, Ju-Ock. Beneficial effects of natural bioactive compounds from Hibiscus sabdariffa L. on obesity. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 210, 2019.

OS ANTIOXIDANTES: dossiê antioxidante. **Revista Food Ingredients Brasil**, nº6, p. 30, 2009. Disponível em: <http://www.unirio.br/ib/dmp/nutricao-integral/arquivos/fontes-de-consulta-complementar/Antioxidantes%20-%20FOOD%20INGREDIENTS%20BRASIL%20No6%20-%202009.pdf>. Acesso em abril de 2022.

PACHECO-COELLO, Franklin et al. Comparación de compuestos fenólicos totales en Hibiscus sabdariffa L. Venezuela. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 48, n. 3, p. 521-527, 2019.

PACHECO, Wagner Felipe et al. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PALMA, José M. et al. Antioxidant profile of pepper (Capsicum annum L.) fruits containing diverse levels of capsaicinoids. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 878, 2020.

PANCHE, Archana N.; DIWAN, Arvind D.; CHANDRA, Sadanandavalli R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, 2016.

PÁSKO, Paweł et al. Bioactivity and cytotoxicity of different species of pitaya fruits—A comparative study with advanced chemometric analysis. **Food Bioscience**, v. 40, p. 100888, 2021.

PIRES, Janaína et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 6, 2017.

PRISA, Domenico. Pitahaya a New Superfood: Cultivation Methods and Medicinal Properties of the Fruit. **Indian Journal of Natural Science**. v. 12, n. 70, p. 37731 – 37739, 2021

PUTRININGTYAS, Natalia Desy et al. Jurnal Gizi Indonesia. **Jurnal Gizi Indonesia (The Indonesian Journal of Nutrition)**, v. 9, n. 1, p. 61-67, 2020.

RABBANI, Naila et al. Reversal of Insulin Resistance in Overweight and Obese Subjects by trans-Resveratrol and Hesperetin Combination—Link to Dysglycemia, Blood Pressure, Dyslipidemia, and Low-Grade Inflammation. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2374, 2021.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, p. 755-760, 2006.

RAVICHANDRAN, Guna et al. Attenuation of protein glycation by functional polyphenolics of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*); an in vitro and in silico evaluation. **Food Research International**, v. 140, p. 110081, 2021.

RENE, Alice et al. How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 20, p. 8703-8710, 2010.

RORIZ, Custódio Lobo et al. Red pitaya (*Hylocereus costaricensis*) peel as a source of valuable molecules: Extraction optimization to recover natural colouring agents. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131344, 2022.

ROSA, L.; MORENO-ESCAMILLA, J.; RODRIGO-GARCÍA, J. et al. Phenolic Compounds. In: YAHIA, M.; CARRILLO-LOPEZ, A. (Ed.). **Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables**. Woodhead publishing, 2018. p. 253-271.

ROCHA, Fábio RP; TEIXEIRA, Leonardo SG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

RODRIGUES, Isaide A; Gomes, S.M.C; Fernandes, Isabel P.G.; Brett A.M.O. Phenolic Composition and Total Antioxidant Capacity by Electrochemical, Spectrophotometric and HPLC-EC Evaluation in Portuguese Red and White Wines. *Eletroanalysis* 31, 1-11, 2019.

SABAGHI, Moslem et al. Strategies of confining green tea catechin compounds in nano-biopolymeric matrices: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 111781, 2021.

SAENJUM, Chalermpong; PATTANANANDECHA, Thanawat; NAKAGAWA, Kouichi. Antioxidative and anti-inflammatory phytochemicals and related stable paramagnetic species in different parts of dragon fruit. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3565, 2021.

SAFIRA, Arifia et al. Review on the pharmacological and health aspects of *Hylocereus* or Pitaya: An update. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 11, n. 6, p. 297-303, 2021.

SALEHI, Bahare et al. Antioxidants: positive or negative actors?. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 124, 2018.

SCHILDER, W. H. et al. Determining the antioxidant properties of various beverages using staircase voltammetry. **Heliyon**, v. 6, n. 6, p. e04210, 2020.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SIES, Helmut. Strategies of antioxidant defense. **European journal of biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, Helmut; BERNDT, Carsten; JONES, Dean P. Oxidative stress. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SIRAG, Nizar et al. Determination of total phenolic content and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx ethanolic extract. **Standard Research Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 034-039, 2014.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SONG, Haizhao et al. Red pitaya betacyanins protects from diet-induced obesity, liver steatosis and insulin resistance in association with modulation of gut microbiota in mice. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 31, n. 8, p. 1462-1469, 2016.

SULIASIH, B. A.; TAWWABIN, R. A.; BUDI, S. Electroanalytical evaluation of antioxidant activity in monofloral honeys. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publing, 2021. p. 012051.

TYŚKIEWICZ, Katarzyna; KONKOL, Marcin; RÓJ, Edward. The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2625, 2018.

UTPOTT, Michele et al. Characterization and application of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel powder as a fat replacer in ice cream. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 5, p. e14420, 2020.

VANGALAPATI, Meena et al. EXTRACTION, MODELING AND PURIFICATION OF CATECHINS FROM *HIBISCUS SABDARIFFA*. **International Journal of Innovative Research in Science and Engineering**, v. 2, p. 191-196, 2016.

VELLOSA, José Carlos Rebuglio et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

VUOLO, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva; JUNIOR, Mário Roberto Maróstica. Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. In: **Bioactive compounds**. Woodhead Publing, 2019. p. 33-50.

WANG, Jin et al. Antioxidant activity of leaf extracts from different Hibiscus sabdariffa accessions and simultaneous determination five major antioxidant compounds by LC-Q-TOF-MS. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 21226-21238, 2014.

YAN, Liang-Jun. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. **Redox Biology**, v. 2, p. 165-169, 2014.

YU, Hyung-Seok et al. Inula britannica inhibits adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes via modulation of mitotic clonal expansion involving ERK 1/2 and Akt signaling pathways. **Nutrients**, v. 12, n. 10, p. 3037, 2020.

XI, Xingyuan et al. Transcriptome analysis clarified genes involved in betalain biosynthesis in the fruit of red pitayas (*Hylocereus costaricensis*). **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 445, 2019.

APÊNDICE A – CÁLCULOS DE CONCENTRAÇÃO

Cálculo da concentração de extrato

Considerou-se para fins de cálculo que a massa de fruto pesada tenha sido $M_F = 10,00 \text{ g}$ e que o volume de extrato bruto obtido de M_F tenha sido $V_{EBruto} = 6,00 \text{ mL}$. Aplicou-se a equação 3 para obtenção do volume necessário de solução extratora SE (mL).

$$SE = 4 \cdot V_{EBruto} \quad (3)$$

$$SE = 4 \cdot 6,00 \text{ mL} = 24,00 \text{ mL}$$

O volume de solução extratora SE foi somado ao volume de extrato bruto V_{EBruto} por meio da equação 4, obtendo-se o volume total V_{Total} .

$$V_{Total} = V_{EBruto} + SE \quad (4)$$

$$V_{Total} = 6,00 \text{ mL} + 24,00 \text{ mL}$$

$$V_{Total} = 30,00 \text{ mL}$$

A seguir, empregou-se a equação 5 para calcular a concentração do extrato, C_{Ext} (mg/mL).

$$C_{Ext} = \frac{M_F \cdot 1000}{V_{Total}} \quad (5)$$

$$C_{Ext} = \frac{10,00 \text{ g} \cdot 1000}{30 \text{ mL}}$$

$$C_{Ext} = 333,33 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Portanto, 333,33 mg/mL seria a concentração de extrato obtida, considerando 10,00 g de fruto e 6,00 mL de líquido extraído. Esses números são hipotéticos, usados apenas para demonstração dos cálculos. Os valores reais variam e devem ser calculados a cada experimento.

Diluição do extrato na célula eletroquímica

A célula eletroquímica empregou $V_{célula} = 15,00 \text{ mL}$ de volume total, composto pelas parcelas de extrato e de eletrólito suporte. A concentração de extrato na célula foi de $C_{célula} =$

50,00 mg/mL. O volume de extrato, V_{Ext} , necessário para atingir essa diluição foi calculado pela equação 6.

$$C_{Ext} \cdot V_{Ext} = C_{Célula} \cdot V_{Célula} \quad (6)$$

$$333,3 \text{ mg/mL} \cdot V_{Ext} = 50,00 \text{ mg/mL} \cdot 15,00 \text{ mL}$$

$$\therefore V_{Ext} = \frac{50,00 \text{ mg/mL} \cdot 15,00 \text{ mL}}{333,3 \text{ mg/mL}}$$

$$V_{Ext} = 2,25 \text{ mL} = 2250 \mu\text{L}$$

O volume de eletrólito suporte, V_{ES} , necessário para completar 15 mL foi obtido por diferença de volumes, conforme a equação 7.

$$V_{ES} = V_{Célula} - V_{Ext} \quad (7)$$

$$V_{ES} = 15,00 \text{ mL} - 2,25 \text{ mL}$$

$$V_{ES} = 12,75 \text{ mL}$$

Diluição do extrato na cubeta espectrofotométrica

Seguiu-se o mesmo procedimento da primeira seção deste apêndice “*Cálculo da concentração de extrato*”. Logo depois, efetuou-se a diluição do extrato original em metanol para obter-se de um extrato padrão com 300,00 mg/mL.

A cubeta espectrofotométrica comportou 3 mL de volume total, soma das parcelas de solução DPPH• (40 μM) e de extrato ou metanol. A concentração de extrato empregada na célula eletroquímica foi de 0, 50, 30 e 20 mg/mL. Usou-se novamente a equação da diluição (equação 8) para esses cálculos.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (8)$$

APENDICE B – DADOS DOS ENSAIOS DE DPPH• PARA OS FRUTOS

Dados da triplicata de Pitaia

Tabela 10: Dados do primeiro ensaio de DPPH• para a pitaia.

Pitaia 1° análise					
Tempo (min)	C=0mg/ml	C=50mg/ml	C=30mg/ml	C=20mg/ml	Média geom.
0	0,39	0,66	0,51	0,46	0,49
5	0,37	0,42	0,33	0,31	0,35
10	0,37	0,30	0,24	0,23	0,28
15	0,37	0,25	0,19	0,19	0,24
20	0,37	0,20	0,15	0,16	0,21
25	0,37	0,17	0,13	0,14	0,19
30	0,36	0,15	0,12	0,13	0,17
Média geom.	-	0,27	0,21	0,21	-

Tabela 11: Dados do segundo ensaio de DPPH• para a pitaia.

Pitaia 2° análise					
Tempo (min)	C=0mg/ml	C=50mg/ml	C=30mg/ml	C=20mg/ml	Média geom.
0	0,33	0,50	0,41	0,40	0,40
5	0,33	0,32	0,27	0,27	0,29
10	0,32	0,23	0,20	0,21	0,23
15	0,32	0,18	0,15	0,17	0,20
20	0,32	0,15	0,13	0,14	0,17
25	0,33	0,13	0,11	0,12	0,15
30	0,33	0,12	0,10	0,11	0,14
Média geom.	-	0,20	0,17	0,18	-

Tabela 12: Dados do terceiro ensaio de DPPH• para a pitaia.

Pitaia 3° análise					
Tempo (min)	C=0mg/ml	C=50mg/ml	C=30mg/ml	C=20mg/ml	Média geom.
0	0,35	0,54	0,40	0,41	0,42
5	0,35	0,39	0,32	0,30	0,34
10	0,35	0,30	0,23	0,23	0,27
15	0,35	0,24	0,19	0,19	0,23
20	0,35	0,20	0,16	0,16	0,20
25	0,35	0,18	0,14	0,14	0,19
30	0,35	0,15	0,12	0,12	0,17
Média geom.	-	0,26	0,20	0,20	-

Dados da triplicata de Hibisco

Tabela 13: Dados do primeiro ensaio de DPPH• para o hibisco.

Hibisco 1° Ensaio					
Tempo (min)	0 mg/mL	50 mg/mL	30 mg/mL	20 mg/mL	Média geom.
0	0,38	0,59	0,43	0,4	0,44
5	0,38	0,41	0,32	0,3	0,35
10	0,38	0,33	0,25	0,25	0,3
15	0,38	0,26	0,21	0,21	0,26
20	0,38	0,22	0,18	0,18	0,23
25	0,38	0,2	0,16	0,16	0,21
30	0,38	0,17	0,14	0,15	0,19
Média geom.	-	0,29	0,22	0,22	-

Tabela 14 :Dados do segundo ensaio de DPPH• para o hibisco.

Hibisco 2° Ensaio					
Tempo (min)	0 mg/mL	50 mg/mL	30 mg/mL	20 mg/mL	Média geom.
0	0,46	0,49	0,44	0,44	0,45
5	0,45	0,33	0,33	0,34	0,36
10	0,45	0,24	0,27	0,29	0,3
15	0,44	0,2	0,23	0,26	0,27
20	0,44	0,15	0,2	0,23	0,24
25	0,44	0,13	0,18	0,21	0,22
30	0,44	0,12	0,16	0,2	0,2
Média geom.	-	0,21	0,24	0,27	-

Tabela 15: Dados do terceiro ensaio de DPPH• para o hibisco.

Hibisco 3° Ensaio					
Tempo (min)	0 mg/mL	50 mg/mL	30 mg/mL	20 mg/mL	Média geom.
0	0,3	0,39	0,35	0,34	0,35
5	0,3	0,29	0,27	0,27	0,28
10	0,3	0,23	0,22	0,22	0,24
15	0,3	0,19	0,18	0,19	0,21
20	0,3	0,17	0,16	0,16	0,19
25	0,3	0,15	0,14	0,15	0,17
30	0,3	0,13	0,13	0,13	0,16
Média geom.	-	0,21	0,2	0,2	-